

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

IDENTITÉ

ENTRE SPIROCHÈTES ET BACILLES FUSIFORMES

LES HÉLICONÈMES « VINCENTI »

par le professeur G. SANARELLI,
Directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.

I. — Origine des prétendues associations fuso-spirochétiennes.

a) CULTURE DES SPIROCHÈTES SUR MILIEUX SOLIDES.

Sur le rôle pathogène, encore si débattu, des associations ou symbioses dites *fuso-spirochétiennes* ou *spiro-bacillaires*, on est toujours loin d'avoir atteint un accord satisfaisant.

Il s'agit, en effet, d'un curieux phénomène que l'on peut considérer comme unique en pathologie.

Depuis les premiers travaux de Vincent (1) sur la pourriture d'hôpital et sur l'angine ulcéro-membraneuse, on a pu rencontrer cette symbiose énigmatique dans une quantité de manifestations morbides différentes.

(1) Sur l'étiologie et sur les lésions anatomo-pathologiques de la pourriture d'hôpital, Ces *Annales*, 1896, p. 488; Recherches bactériologiques sur l'angine à bacilles fusiformes. *Ibidem*, 1899, p. 609.

Dans mon précédent mémoire sur les *spirochètes cœcaux* (1), j'ai mentionné plus d'une soixantaine de processus pathologiques, aigus ou chroniques, chez l'homme et chez les animaux domestiques, intéressant les organes et les tissus les plus divers, dans lesquels apparaissent simultanément ces deux inséparables figures microbiennes : les *spirochètes* et les *bacilles fusiformes*.

Au cours de ces dernières années, l'attention sur les *fusospirochètoses* n'a cessé de s'accroître, et on peut dire que les publications sur ce sujet se succèdent sans interruption. Mais il s'agit, généralement, de simples constatations microscopiques ou de tentatives plus ou moins heureuses, pour obtenir ces microbes en culture pure.

La question n'a cependant pas fait beaucoup de progrès, car les tentatives d'isolement ont toujours échoué. On discute encore, en effet, sur la valeur pathogénique à attribuer à chacun des deux microbes symbiotiques. Tout récemment nous en avons eu une preuve dans les vives discussions qui eurent lieu à l'Académie de Médecine de Paris au sujet des recherches de F. Bezançon (2) et de celles de Vincent (3) sur l'étiologie et la pathogénie de la gangrène pulmonaire.

Peut-être le problème est-il un peu moins obscur du fait de l'isolement en culture pure et de l'étude expérimentale des *spirochètes intestinaux*.

Il est vrai que ces *spirochètes*, que j'ai isolés de la rate et du sang du cœur de cobayes morts à la suite de causes diverses, provenaient très probablement de la flore fécale ou de la flore buccale des mêmes animaux. C'est précisément pour cela que je n'ai nullement essayé de les comparer ni de les identifier avec quelques-uns de ces innombrables types de *spirochètes*, longs ou courts, trapus ou grêles, à spires lentes ou serrées, décrits ou signalés par nombre d'auteurs dans les processus pathologiques les plus différents.

(1) Les *spirochètes cœcaux*. Ces *Annales*, 1927, p. 1.

(2) Cultures des *spirochètes* des hémoptysies tuberculeuses. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 24 avril 1926; *Bactériologie de la gangrène pulmonaire*. *Ibidem*, 8 mars 1927.

(3) Étiologie et pathogénie de la gangrène pulmonaire. *Bull. de l'Acad. de Médecine*, 22 février 1927; A propos de deux nouveaux cas de gangrène pulmonaire. *Ibidem*, 8 mars 1927.

Mais, pendant plus d'un an, sur mes spirochètes cœcaux, après avoir effectué des comparaisons et des constatations diverses sur le sujet en question, je dois avouer que je suis plutôt tenté aujourd'hui de considérer ces microorganismes demi-anaérobies, spiralés, fragiles, difficiles à cultiver et à conserver, peu perméables aux couleurs d'aniline, très pléomorphes, etc..., dans des circonstances si nombreuses et si variées, apparaissant comme les représentants d'une seule et même famille bactérienne, très intéressante du point de vue biologique, bien que, peut-être, assez peu importante au point de vue pathogénique.

En effet, ces microbes semblent dépourvus, au moins expérimentalement, de propriétés pathogènes spécifiques.

Cette conception, déjà énoncée dans mon mémoire précédent, s'est encore affirmée, après l'étude complète que, dans ces derniers temps, j'ai pu faire de ces microorganismes. J'avais même réussi, récemment, à obtenir des cultures luxuriantes de mes spirochètes en les faisant développer sur les milieux solides de Tarozi.

On sait que, pour la préparation des milieux de Tarozi — pour anaérobies —, on introduit au fond des tubes de gélose inclinés, c'est-à-dire au contact immédiat de leur eau de condensation, un petit fragment de rein, de rate ou de glande surrénale d'un cobaye neuf. Dans ces milieux, les microbes anaérobies, qui ne sont pas capables d'utiliser pour leurs besoins l'oxygène moléculaire, utilisent l'oxygène atomique déjà fixé sur les substances organiques mortes. En effet, ces dernières, en présence de l'air, fixent continuellement de l'oxygène.

Tandis que les spirochètes ne se développent pas sur la gélose ordinaire ou n'y donnent que des cultures insignifiantes, dans les milieux de Tarozi ils se développent rapidement, en formant des enduits glaireux assez abondants. Ces cultures commencent au voisinage immédiat du fragment d'organe situé au fond du tube et se répandent en trois à quatre jours à la surface de la gélose, sur un espace de 1 centimètre environ.

L'étude des cultures m'a permis de compléter mes observations sur la biologie des spirochètes.

Si, pour le repiquage, on part d'une culture de spirochètes âgée de cinq à six jours et pour cela constituée presque exclu-

sivement par des corps coccoïdes, on peut constater que la nouvelle culture se développe déjà au bout de vingt-quatre heures.

Pendant cette première phase de germination et de multiplication, les spirochètes fourmillent déjà en grande quantité dans le liquide de condensation et se montrent exclusivement sous la forme de bactéries, de vibrions ou de spirochètes courts, avec deux courbures seulement et doués de mouvements très rapides. L'examen microscopique le plus attentif ne révèle pas la présence de corps coccoïdes, pas même de ceux que le jour précédent on avait introduits pour le repiquage, avec l'anse de platine.

Au bout de deux jours, la glaire fait son apparition et commence à monter à la surface de la gélose, au-dessus du fragment d'organe. Parmi les spirochètes, qui ont alors déjà atteint leur développement complet, apparaissent les premières granulations coccoïdes, généralement très petites, mais qui se colorent aisément par la fuchsine phéniquée diluée.

Examinés en champ obscur, les spirochètes adultes présentent une locomotion analogue à celle des *leptospires*. Ils progressent avec une certaine lenteur, en décrivant des mouvements hélicoïdaux, ou bien ils se déplacent avec de vives contorsions, en avançant comme de petites couleuvres. Par intervalles on observe, d'une façon bien nette, que leur corps est constitué par un ruban recroquevillé ou enroulé en spirale autour de son axe et de cette manière, lorsqu'on fait usage de l'éclairage latéral, ils peuvent prendre l'aspect de chaînettes de streptocoques. Quelquefois les spires sont serrées les unes contre les autres, mais parfois encore elles apparaissent espacées. Dans ce dernier cas, le microbe présente peu de spires et il est nettement rubanné.

C'est pour cela que, dans les frottis colorés sur lames, les spirochètes peuvent se présenter avec des tours de spires plus ou moins serrés, ce qui a inspiré à certains auteurs des classifications artificielles, basées sur le resserrement des spires de ces microbes, façonnés comme un ressort à boudin, et sur la plus ou moins grande lenteur de leurs mouvements.

Au troisième jour, la glaire qui monte sur la gélose à proximité du fragment d'organe est bien visible et relative-

ment abondante. Elle présente une couleur brunâtre et une consistance molle, pâteuse, parfois mucôide. L'examen microscopique y révèle déjà une formation abondante de corps coccoïdes, ayant des dimensions variables, mais dont l'affinité vis-à-vis de la fuchsine phéniquée diminue toujours davantage. Entre le cinquième et le sixième jour la culture atteint son développement complet. Généralement, l'enduit glaireux ne dépasse pas le fragment d'organe de plus d'un centimètre. Mais souvent, çà et là, à la surface de la gélose, peuvent apparaître, à des distances plus grandes, des colonies isolées, lenticulaires, luisantes, brunâtres, dont le développement s'arrête rapidement.

Pendant ce stade de la culture on constate, à l'examen microscopique, que les spirochètes sont devenus extrêmement rares. La culture est presque exclusivement constituée par des corps sphériques, de dimensions variables et très faiblement colorés par la fuchsine phéniquée diluée. Pour obtenir une coloration satisfaisante, il faut tenir les lamelles dans le liquide colorant au moins durant vingt-quatre à trente-six heures, à la température de 37°.

On voit alors nettement que ces corps coccoïdes sont constitués par des éléments presque ronds, colorés en rose et qui ressemblent à de petits noyaux de leucocytes ou à de petits kystes, aux contours bien nets, et ayant au centre un point fortement coloré, en guise de nucléole. Les frottis de culture, sur lames, donnent l'aspect d'un véritable tissu de granulation ou de groupements en zoogléa au milieu de laquelle les spirochètes survivants apparaissent comme de petites filaires dans un frottis de sang (Pl. I, fig. 8-9).

Il n'est pas facile d'expliquer le rôle de ces éléments qu'on a improprement appelés coccoïdes. En effet, ils n'ont pas l'aspect de coccus, mais ressemblent à de petits amas sphériques de protoplasma raréfié, de dimensions très variables, très résistants à la pénétration des substances colorantes. Souvent leur volume est apparemment plus grand que celui du spirochète dont ils dérivent. Pour éviter toute ambiguïté, on devrait substituer aux mots imprécis de *corps coccoïdes* la dénomination de *corps globuleux* ou *sphéroïdes*.

Les cultures spirochéliennes sur milieux de Tarozzi peuvent

être aisément repiquées sur des milieux nouveaux, même lorsqu'elles sont âgées d'un mois. Mais comme dans les vieilles cultures, constituées par des amas de corps sphéroïdes, on réussit généralement à déceler quelques spirochètes survivants, il est impossible d'affirmer que la nouvelle culture dérive des corps susdits ou des spirochètes survivants, ou bien encore des deux formes à la fois.

Que représentent ces corps globuliformes ?

Depuis quelque temps déjà, on discute la question de leur rôle biologique. Dès les premières publications de Dutton et Todd (1) et de Leishmann (2) sur la production de granulations par le *Spirochaeta duttoni*, dans le cæcum de *Ornithodoros moubata*, on peut dire que ce phénomène a été signalé par divers auteurs chez tous les spirochètes successivement étudiés : spirochètes des poules, tréponème de la syphilis, spirochètes bronchiaux et urétraux, *Spirochaeta ictero-hæmorrhagiæ*, etc.

Récemment même, Y. Kermorgant (3) a observé la formation de granulations globuliformes dans les cultures d'un spirochète qu'il avait obtenu en culture mixte de la bouche de sujets atteints d'oreillons. Les caractères de ce spirochète, que Y. Kermorgant a décrit comme agent spécifique de la parotidite ourlienne, ne diffèrent pas de ceux de mes spirochètes cæcaux.

D'après quelques auteurs, les granulations spirochètiennes ne seraient que des produits de dégénérescence ou d'involution. Suivant d'autres, au contraire, elles constitueraient une phase de l'évolution cyclique des spirochètes : leur phase corpusculaire ou métacyclique ; enfin, selon d'autres encore, elles seraient des spores capables de prolifération ultérieure, ou bien des formes sexuées ou des formes de défense analogues à celles qui apparaissent chez les protozoaires dans des conditions défavorables d'existence, etc. Selon Y. Kermorgant, elles représenteraient les formes filtrables des spirochètes.

(1) Morphology and life history of *Spirochaeta duttoni*. *Annals of tropical med. and parasit.*, 1908, p. 435; The granules of *Spirochaeta duttoni*. *Bull. de la Soc. de pathol. exotique*, 1919, 12, n° 9.

(2) Granules clumps in *Ornithodoros moubata* and their relation to the spirochaeta of African relapsing fever. *Ces Annales*, 1918, p. 49.

(3) Contribution à l'étude de l'étiologie des oreillons. *Ces Annales*, 1923, p. 165.

Le débat est encore ouvert, d'autant plus que, dès la constatation de formes analogues en circulation dans le sang des syphilitiques (1), l'intérêt présenté par ces formations sphéroïdales s'est manifesté encore plus vif au point de vue pathologique et nosologique.

Les tubes de gélose de Tarozi ne restent pas vaccinés après avoir donné une bonne culture de spirochètes. Et, même après avoir raclé l'enduit qui s'est développé en trois ou quatre jours, ou l'avoir enlevé par lavages, on peut encore observer, au bout de quelques jours, le développement d'une nouvelle culture spirochétienne; et cela, pourvu qu'on introduise dans le tube un peu d'eau peptonée afin d'empêcher le desséchement du fragment d'organe.

b) EXPÉRIENCES CHEZ LES ANIMAUX.

La possibilité d'obtenir, sur les milieux de Tarozi, un matériel spirochétien frais et abondant m'a incité de nouveau à essayer l'action de ces microbes sur l'organisme animal. J'ai inoculé dans le péritoine de petits cobayes de grandes quantités de culture spirochétienne (raclage de quatre ou cinq cultures). Des quantités moindres ne donnent aucun résultat. En employant les doses élevées, on obtient généralement la mort de l'animal en quelques heures. A l'autopsie, on trouve le plus souvent un exsudat trouble et hématique dans le péritoine, des urines albumineuses et une entérite plus ou moins accentuée, due, probablement, à l'élimination intestinale des spirochètes ou de leurs protéides provenant de la muqueuse péritonéale et déversés dans la circulation.

Le liquide péritonéal fourmille de petits spirochètes qui — à l'ultra-microscope — se montrent doués de mouvements très vifs. Ils ont l'aspect de formes très jeunes, ce qui porte à croire que dans la cavité du péritoine a lieu effectivement une multiplication de ces microorganismes.

Même en partant du sang du cœur et de divers autres organes, on réussit à obtenir des cultures spirochétiennes. Mais l'injection de la totalité de l'exsudat péritonéal, même abondant

(1) H. JAUSION et A. PECKER, Polymorphisme et évolution du tréponème *Paris médical*, 1927, p. 230.

dans le péritoine d'un second cobaye, reste sans résultat. On ne réussit pas à obtenir des passages en série de péritoine à péritoine et, par conséquent, les tentatives faites par ce moyen pour rendre virulent le spirochète cæcal restent vaines.

J'ai essayé d'inoculer les spirochètes sur la peau de cobayes et de jeunes chiens, préalablement cautérisée par du nitrate d'argent ; j'ai associé d'autres microbes — colibacille, *B. proteus*, staphylocoques, *B. mesentericus vulgatus*, etc. — aux spirochètes ; j'ai aussi inoculé ces mélanges microbiens sous la peau des animaux, avant et après l'injection de chlorure de calcium, dont on connaît l'action désagrégeante sur les tissus. Mais les résultats se bornèrent toujours à des infiltrations banales, localisées, suppurées ou non ; au niveau de celles-ci, ni l'examen extemporaine, ni les cultures ne décelaient de spirochètes.

c) IDENTITÉ MORPHOLOGIQUE DES SPIROCHÈTES DE LA CAVITÉ BUCCALE ET DE L'INTESTIN.

Si au point de vue pathogénique, ces recherches n'ont apporté rien de nouveau en ce qui concerne la morphologie et la biologie, toutefois, elles ont fait ressortir des faits peut-être intéressants.

J'ai observé, par exemple, que dans les cultures en gélatine à 37°, les spirochètes se développent souvent sous la forme de spirilles identiques à ceux de la bouche, à ceux de la bronchite hémorragique ou à ceux de l'angine ulcéro-membraneuse. Je dois à l'obligeance de mon savant confrère, le professeur Vincent, quelques lames avec des frottis de pseudo-membranes angineuses, où l'on observe des quantités de spirilles, mélangés avec des bacilles fusiformes. En comparant la reproduction microphotographique d'une de ces préparations (voir fig. 4 de la pl. 1) avec les microphotographies d'une préparation faite avec le produit de raclage de mes gencives (fig. 5) et d'une préparation de spirochètes cæcaux provenant d'une culture en gélatine, de quatorze jours (fig. 2 et 3), on observe que l'aspect de tous ces spirochètes est absolument identique. Cette constatation a été confirmée par quelques confrères, qui ont examiné ces préparations.

Il faut remarquer que les spirochètes, étudiés à l'état naturel, présentent une spirale serrée et régulière, tandis que, dans les frottis colorés, ils se montrent souvent courbés comme de petites couleuvres. On sait, en effet, que leurs spires apparaissent plus ou moins lâches ou plus ou moins serrées, suivant qu'ils ont été plus ou moins promptement fixés ou desséchés sur la lame.

Outre cela, les spirochètes — spécialement quand ils se développent dans le dépôt mucilagineux qu'ils forment au fond des tubes de gélatine à 15 p. 100, tenus dans l'étuve — prennent l'aspect de filaments très longs, souvent spiralés et qui s'entrelacent et s'entortillent comme on peut le voir dans les figures 6 et 7.

d) LES PRODUITS SOLUBLES DU *B. mesentericus vulgatus*

TRANSFORMENT LES FIGURES SPIRALÉES

DES SPIROCHÈTES EN BACILLES FUSIFORMES.

Au cours de mes études sur la manière dont se comportent les spirochètes en symbiose avec d'autres microbes, quelques faits m'ont amené à des constatations tout à fait inattendues.

J'ai, par exemple, observé que les spirochètes se développent d'une façon extraordinaire lorsqu'ils se trouvent en symbiose avec un microbe très banal et très répandu, le *B. mesentericus vulgatus* (bacille de la pomme de terre).

Il est fort curieux d'observer la façon luxuriante dont se développent ces deux microorganismes lorsqu'ils vivent ensemble, et de constater en même temps l'action favorisante du *B. mesentericus vulgatus* sur le spirochète.

J'ai signalé maintes fois les difficultés que l'on rencontre pour obtenir les cultures spirochétiennes en bouillon de viande. Lesensemencements demeurent toujours stériles. Mais si, dans le bouillon, on introduit à la fois une anse de spirochètes et une anse de *B. mesentericus*, les spirochètes commencent à se multiplier tout de suite et, au bout de vingt-quatre heures, ils pullulent dans le milieu, se massent autour des gros bacilles mésentériques et des buissons touffus formés par ces derniers. Au bout de trois à quatre jours, dans les préparations microscopiques colorées par la fuchsine phéniquée diluée, on observe,

parmi des entrelacements et des écheveaux de gros bacilles, des amas très serrés d'une quantité énorme de spirochètes et de corps coccoïdes (fig. 10). Cette sorte de feutre symbiotique, d'aspect presque mycélien, se dépose ensuite presque complètement au fond du tube. Si on soulève ce dépôt avec l'anse de platine, on voit qu'il a une consistance mucilagineuse et, au microscope, il apparaît formé par des *B. mesenterici* entrelacés avec de longs et très élégants filaments spirochéliens.

Même au bout d'un mois, ce dépôt muqueux montre, au milieu du réseau dense des gros *B. mesenterici*, beaucoup de spirochètes typiques. La transformation en corps coccoïdes semble être, dans ces cultures symbiotiques, beaucoup plus tardive que dans les cultures pures spirochétiennes, spécialement si ces dernières se sont développées sur des milieux solides.

L'action favorisante exercée par un microbe aussi banal que le *B. mesentericus* n'est pas seulement due à une simple influence vitale ou de présence de ce germe aérobie, auquel on pourrait attribuer le rôle de faciliter les conditions d'anaérobiose relative exigées par les spirochètes. Elle s'exerce principalement par les produits du métabolisme des *B. mesentericus*. En effet, si l'on introduit une anse de spirochètes dans des tubes contenant une culture en bouillon du *B. mesentericus*, âgée de dix jours et filtrée sur une bougie Berkefeld et que, d'autre part, onensemence d'autres tubes de simple eau peptonée et de filtrat de *mesentericus* dilué avec 1/3 d'eau peptonée, on observe les résultats suivants :

Au bout de trois jours d'étuve, dans les tubes témoins d'eau peptonée on voit, comme à l'ordinaire, de rares et petites formes vibrioniennes et spirillaires, tandis que dans les tubes contenant le filtrat de *mesentericus*, pur ou dilué, le nombre des spirochètes est beaucoup plus grand (fig. 12).

Au bout de six jours, dans les tubes témoins on observe encore de rares formes spirillaires et beaucoup de granulations; les cultures sont toujours malingres. Au contraire, dans les tubes de filtrat de *B. mesentericus* dilué, le développement microbien est luxuriant et l'on y observe, en outre, un voile mince superficiel. A l'examen microscopique, ce voile délicat apporte une vraie surprise, car il se montre constitué non seulement de

spirochètes, mais aussi d'une quantité très grande de bacilles à l'aspect nettement fusiforme.

Dans les tubes de filtrat mésentérique pur, le développement de la culture se montre très luxuriant. Si l'on agite avec l'anse le liquide, déjà bien trouble, on observe que celui-ci a une consistance mucilagineuse, filante. L'examen microscopique du voile superficiel apporte même dans ce cas une autre surprise, car le voile se montre constitué par un feutre d'aspect mycélien, serré et très élégant de seuls bacilles longs, classiquement fusiformes. On ne réussit à y déceler aucun spirochète (fig. 13 et 14).

Au bout de douze jours, on rencontre dans les tubes témoins, particulièrement dans leur dépôt, des masses de petits spirochètes et de corps sphéroïdes. Dans les tubes de filtrat de *B. mesentericus* dilué on voit, au milieu d'une grande quantité de corpuscules sphéroïdes et de bacilles fusiformes, de rares spirochètes survivants, encore bien reconnaissables. Mais dans les tubes de filtrat mésentérique pur, le dépôt est exclusivement constitué par une quantité énorme de corps sphéroïdes et de bacilles fusiformes typiques, de toutes dimensions, depuis les formes courtes, en navette, jusqu'aux formes allongées, avec un renflement central et des extrémités effilées, et aux formes très longues, filamenteuses. On n'y rencontre aucun spirochète.

Ces observations, bien simples, me dévoilèrent tout à coup l'origine, jusqu'à présent mystérieuse, des prétendues associations et symbioses fuso-spirillaires ou fuso-spirochétiennes ou spiro-bacillaires.

Les bacilles fusiformes ne seraient donc que le résultat d'une transformation morphologique des spirochètes.

Evidemment, cette mutation a lieu sous l'influence exercée par des produits du métabolisme de germes banaux, simultanément présents. Etant donné que ces microbes ne manquent jamais, surtout dans les couches les plus externes et superficielles, lors de processus putrides, ulcéreux, nécrotiques, etc., où l'on constate l'existence de la prétendue symbiose fuso-spirochétienne, on comprend facilement de quelle manière les spirochètes peuvent présenter l'aspect de bacilles fusiformes.

Ces prétendues symbioses se rencontrent exclusivement dans les processus morbides qui sont en contact avec le milieu

extérieur, plus ou moins contaminé. On comprend donc pourquoi, à l'examen histologique de tissus frappés de nécrose, de processus ulcéreux, etc., et dans lesquels s'est implantée l'association fuso-spirochétienne, la plus grande partie des formes en fuseau sont rencontrées dans les couches superficielles, c'est-à-dire externes, où pullulent en même temps beaucoup d'autres espèces microbiennes. Et au contraire, on s'explique aussi pourquoi, dans les zones profondes qui touchent aux limites des tissus sains, c'est-à-dire qui sont loin de la flore microbienne de la surface, on rencontre les spirochètes seuls et presque à l'état de pureté.

Cette modification morphologique, que l'on observe dans les vieilles cultures en bouillon, filtrées, de *B. mesentericus*, n'est certainement pas due à un appauvrissement du milieu, que l'on pourrait considérer comme déjà exploité ou épuisé par une culture précédente.

Au contraire, dans ces bouillons mésentériques filtrés, le développement des spirochètes s'accomplit beaucoup mieux que dans l'eau peptonée et se montre beaucoup plus luxuriant que dans le simple bouillon, où les spirochètes ne s'implantent qu'avec une certaine difficulté.

On doit donc penser à une action favorisante de produits du métabolisme de *B. mesentericus*.

Et, en effet, si on ensemence les spirochètes dans des filtrats de mésentériques, on observe l'apparition de bacilles fusiformes, en grande quantité déjà à partir du quatrième jour dès l'ensemencement. Mais si l'on pratique ce dernier dans des filtrats de *mesentericus* chauffés à 100° pendant dix minutes, le développement des spirochètes est moins abondant, et l'apparition des fusiformes est bien plus rare et plus tardive, n'ayant lieu que vers le sixième jour.

Cela indique que des produits thermolabiles, probablement de nature enzymatique, exercent une influence sur la transformation des formes spiralées en formes fuselées. On sait, en effet, que le *B. mesentericus vulgaris* est un des producteurs les plus énergiques de ferments solubles. Selon la composition du milieu où il est cultivé, il produit de l'amylase, de l'invertine ou sucrase, de la présure, de la caséase, du ferment liquéfiant la gélatine, etc.

Les repiquages abondants de spirochètes dans les tubes témoins, contenant du bouillon ordinaire ou de l'eau peptonée, ne donnent jamais lieu à la production des formes en fuseau. Bien plus, entre le quatrième et sixième jour on observe la transformation presque totale des petites et rares formes spirochétiennes, en granulations sphéroïdales très menues.

J'ai déjà dit que ces granulations acquièrent souvent des dimensions qui ne sont pas proportionnées à l'épaisseur des microbes dont elles dérivent. Pour cela, on doit les considérer comme le résultat de la transformation totale du filament bactérien en corps sphéroïdes, plutôt que comme le résultat de la fragmentation granuleuse du filament lui-même.

II. — Morphologie et biologie des bacilles fusiformes.

Les « héliconèmes sphérogènes Vincenti ».

a) CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES BACILLES FUSIFORMES.

Cette transformation morphologique des spirochètes, qui se manifeste rapidement en peu de jours dans des cultures filtrées de *B. mesentericus*, n'est pas stable.

En effet, si même au bout de douze jours on pratique des passages — au moyen de la pipette — en bouillon ordinaire ou en eau peptonée, on observe, au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, la réapparition des formes spirochétiennes. Dans quelques-uns des tubes se développent, d'abord, seulement des bacilles fusiformes, mais, plus tard, les spirochètes réapparaissent. La forme en fuseau que les spirochètes acquièrent sous l'influence de ferments microbiens déterminés doit donc être considérée comme très instable et facilement reversible.

On connaît déjà, en microbiologie, quelques faits qui démontrent que des microbes peuvent se présenter avec des aspects différents, selon les conditions du milieu où ils se développent. L'exemple le plus connu — et peut-être le plus ancien — en est donné par le b. pyocyanique. Les études de Guignard et Charrin (1) ont démontré que ce microbe se déve-

(1) Sur le polymorphisme des microbes. *Journal de Médecine*, n° 2, 1888.

loppe dans le bouillon ordinaire comme un bâtonnet très court ; dans les bouillons additionnés de substances nuisibles (acide borique, thymol, etc.) il apparaît, suivant la nature et la dose de l'antiseptique, sous la forme de bâtonnets très allongés, de longs filaments flexueux et de spirilles. Mais si l'onensemence une de ces cultures contenant des formes anormales dans du bouillon ordinaire, on voit réapparaître la forme normale.

Metchnikoff (1), lui aussi, avait observé que le *Spirobacillus Cienkowskii* — agent d'une maladie infectieuse des daphnies — acquiert respectivement les formes de bactéries ovalaires, de bacilles droits, de longs bacilles courbés et de spirilles, suivant les milieux dans lesquels on le cultive. Si on observe les figures de la planche qui accompagne ce mémoire de Metchnikoff, on voit très bien que le *Spirobacillus* donne même lieu à la formation de b. fusiformes.

Karlinski (2) a décrit un microbe qui tue les souris blanches avec des symptômes de septicémie et qui se présente, selon les conditions des milieux de culture, sous les formes les plus différentes, depuis la forme d'un bâtonnet très court ou d'un coccus, jusqu'à celle de spirille.

En 1910, Castellani (3) a décrit les caractères morphologiques assez curieux de son *Vibriothrix zeylanica*, que l'on isole souvent de l'intestin, que l'on peut facilement cultiver dans tous les milieux et qui peut acquérir les aspects les plus différents : vibro-spirochétien, bacillaire, filamenteux, ramifié, en massue, globuliforme, etc. Il s'agit d'un germe polymorphe et les diverses formes se trouvent tellement associées ensemble qu'on n'a pas la possibilité d'obtenir des cultures monomorphes.

Winogradsky (4) a démontré que, moyennant des artifices de culture, on peut faire développer son ferment nitrique, sous deux formes différentes qui en font deux variétés différentes : l'une représentée par des monades, l'autre par des zooglées. Mais ces deux variétés ne sont pas généralement stables. On observe

(1) Contribution à l'étude du pléomorphisme des bactéries. Ces *Annales*, 1889, p. 61.

(2) Ein neuer pathogener Spaltpilz. *Centralbl. f. Bakt.*, 5, 1889, p. 193.

(3) M. PERUZZI, A morphological and cultural investigation of *Vibriothrix zeylanica* Castellani. *The Journ. of Trop. Med. and Hyg.*, 1926, p. 44.

(4) A. RODET. *De la variabilité dans les microbes*. Paris, Baillière, éd., 1894, p. 27.

souvent, dans la série des cultures de l'une des formes, l'apparition brusque de l'autre variété, même sans l'influence de causes appréciables.

Cependant, au cours de mes recherches, j'ai pu obtenir des cultures pures et stables de bacilles fusiformes, avec tous les caractères que leur ont attribués les divers auteurs qui se sont occupés de la question.

Même ici — comme il arrive parfois au cours de longues recherches — une circonstance fortuite m'a placé sous la main une souche bien stable de *b. fusiformes*.

Pour conserver vivante, pendant la longue période des vacances d'été, ma souche de spirochètes cœaux, j'avais eu soin de préparer plusieurs cultures de ces microbes dans différents milieux. Les cultures avaient été ensuite placées dans une boîte où circulait de l'eau fraîche.

De retour au laboratoire, au début du mois de novembre, je dus constater que toutes les cultures en milieux liquides et semi-solides (bouillon, eau peptonée contenant ou non du sang, milieu de Noguchi, sérum, sang défibriné, etc.) étaient irréparablement perdues. J'ai craint alors d'avoir perdu définitivement mon spirochète, dont la conservation à l'état de pureté avait exigé tant de soins ! Mais, par des repiquages abondants, en sang défibriné et en eau peptonée contenant du sang, du dépôt dense, muqueux, légèrement rougeâtre, qui se trouvait au fond de quelques tubes de gélatine à 45 p. 100 — tenus d'abord à 37° pendant quelques jours, et puis placés à une température plus basse — j'ai pu réussir ultérieurement des repiquages.

Quelques-uns de ces tubes de gélatine avaient été protégés par une couche épaisse d'huile de vaseline. Dans mon précédent mémoire, j'ai déjà dit que la gélatine en couche profonde et maintenue pendant quelques jours à 37°, s'était montrée le meilleur milieu nutritif pour conserver vivants, le plus longtemps possible, ces fragiles microorganismes. Cette méthode de conservation est même employée par Kauders (1) pour les parasites du sang paludéen destiné au traitement de la syphilis.

(1) Zur Technik der Wagner-Jauregg'schen Malaria-therapie in der Praxis. Ueber Malaria-blutkonservierung. *Seuchenebekämpfung*, 3, n° 1, 1926, p. 48.

Ainsi, du repiquage de ces tubes de gélatine, qui s'étaient conservés très purs pendant trois mois, sous la couche d'huile de vaseline, j'ai réussi à obtenir de nouveau d'autres cultures de spirochètes pures et caractéristiques.

J'ai réussi des repiquages, même en utilisant d'autres tubes de gélatine qui n'avaient pas été protégés par l'huile de vaseline. Mais ces derniers fournirent des cultures de bacilles fusiformes typiques au lieu de cultures de spirochètes !

Donc, non seulement le vieillissement, mais aussi le séjour prolongé dans un milieu nutritif exposé au contact de l'oxygène atmosphérique, avaient été capables de transformer une culture de spirochètes en une culture de *b. fusiformes*.

Cette transformation a conservé et conserve encore aujourd'hui, c'est-à-dire depuis sept mois et après beaucoup de passages dans des milieux divers, son caractère permanent. Dans tous les milieux, les cultures de ces *b. fusiformes* présentent le même aspect des cultures spirochètiennes. Elles se développent assez lentement en bouillon et en eau peptonée et, dans ces milieux, les ensemencements doivent être abondants. En surface, sur la gélose ordinaire, sur gélose-sérum, ou sur gélose-ascite, ainsi qu'à la température du laboratoire, ces microorganismes ne se cultivent pas. En surface sur la gélose inclinée contenant, au fond, du sang ou des fragments d'organes, la culture se développe, à proximité du fond, comme une mucosité dense, luisante, brunâtre. Parfois, des colonies isolées, lenticulaires, à bords réguliers, de couleur brunâtre, se développent même un peu plus loin du fond. Il est absolument impossible de distinguer ces cultures de celles proprement spirochètiennes.

Dans la gélatine à 37°, les *b. fusiformes* forment, comme les spirochètes, un voile superficiel délicat, de couleur rosée et qui tombe ensuite au fond du tube, tandis que la gélatine reste parfaitement limpide. Ni les spirochètes, ni les *b. fusiformes* ne produisent de l'indol; ni les uns, ni les autres ne se cultivent en présence de très faibles quantités de bleu de méthylène que l'on emploie pour étudier l'action réductrice des bactéries; enfin, ils ne se développent pas dans les milieux au nutrose de Barsiekow, en présence des cinq sucres (saccharose, lactose, maltose, glucose, mannite) et de même ne se cultivent

pas dans les bouillons sucrés et additionnés de 5 p. 100 de teinture de tournesol au point de réaction neutre (Hp7). On cultive, au contraire, ces microorganismes dans l'eau peptonée contenant la série des cinq sucres à 1 p. 100, sans qu'on puisse constater la production d'acides ou de gaz (1). On les cultive même très bien dans les bouillons contenant des fragments d'organes frais de cobaye (rein, foie, rate). Dans ces milieux ils forment un voile superficiel qui, plus tard, tombe au fond. Dans les bouillons additionnés de fragments de foie, le liquide acquiert, avec le temps, un aspect muqueux et presque filant.

Les b. fusiformes se montrent, comme les spirochètes, très sensibles aux acides. Ils se développent dans le lait sans le coaguler. Enfin, dans les cultures sur gélose de Tarozzi, le début de leur reproduction est marqué — de même que pour les spirochètes — par des formes très petites.

Vingt-quatre heures après le repiquage, l'eau de condensation de la gélose inclinée pullule déjà de courts bâtonnets droits, que l'on ne saurait différencier d'autres bactéries banales; au bout de deux jours, ils commencent, cependant, à devenir fuselés, tandis qu'on observe l'apparition des corps sphéroïdes, qui, dans ce stade, prennent bien la fuchsine phéniquée diluée (fig. 17 et 18). Pendant les jours successifs la forme en fuseau est parfaite. On rencontre toutes les figures caractéristiques et bien connues de ces microbes : formes fuse-lées courtes, formes allongées, courbées en S, avec un ou deux renflements et des extrémités effilées; formes avec un renflement central contenant un ou plusieurs vacuoles; formes accouplées (diplo-fuseaux); formes filamenteuses, etc. (fig. 15 et 16). En même temps, les corps coccoïdes, absolument identiques à ceux des spirochètes, deviennent rapidement fort nombreux et toujours moins colorables. Enfin, vers le sixième jour, les cultures se montrent constituées, comme celles des spirochètes, par une quantité énorme de gros corps sphéroïdes, parmi lesquels on peut encore observer de rares bacilles fusiformes survivants (fig. 19 à 22).

(1) Après avoir été cultivée pendant un an sur milieux artificiels, la souche spirochètienne n'est plus capable d'attaquer les sucres. Dans mon premier mémoire j'ai déjà dit, en effet, que le spirochète cæcal, récemment isolé, se développait dans le bouillon lactosé ou dans le lait, acidifiant rapidement le milieu.

Somme toute, l'aspect des cultures de la souche fusiforme a toujours été parfaitement identique à celui présenté par les cultures de la souche originaire spirochétienne. En outre, les b. fusiformes exercent, eux aussi, une action réductrice sur les milieux contenant du sang. Comme les spirochètes, ils transforment *in vitro* l'hémoglobine en mélanine. La seule différence qu'on a pu remarquer dans la souche fusiforme, vis-à-vis de la souche spirochétienne mère, consisterait dans son adaptation plus facile aux conditions d'aérobiose. Si l'onensemence, en effet, deux tubes de gélatine à 15 p. 100 et qu'on les porte à l'étuve à 37°, on fait, au bout de vingt-quatre heures, la constatation suivante : le tube repiqué avec des spirochètes ne montre encore aucune trace de végétation ; au contraire, un voile très mince, à reflets bleuâtres, se dessine déjà à la surface du tube repiqué avec des b. fusiformes. L'examen microscopique de ce voile, qui se développe rapidement pendant les jours suivants et tombe ensuite au fond, démontre qu'il est constitué par des myriades de très petits et très grêles bâtonnets, droits, aux extrémités effilées.

Au deuxième ou troisième jour on voit apparaître un voile, même à la surface du tube ensemencé avec les spirochètes. A son tour, ce voile, qui se montre constitué par d'innombrables spirochètes, devient plus épais et tombe ensuite, lui aussi, au fond, en formant un dépôt légèrement teinté de rose.

Les gélatines restent toujours transparentes et on n'observe plus, à leur surface, de voiles épais. Dans la gélatine liquide, même quand elle redevient solide à la température du laboratoire, les spirochètes et les bacilles fusiformes conservent longtemps leur aspect caractéristique respectif, sans subir la transformation en granulations sphéroïdes.

Actuellement, je cultive parallèlement, dans la gélatine liquide et dans les milieux de Tarozzi, les deux formes microbiennes que je repique régulièrement depuis sept mois environ, tous les quatre ou cinq jours. D'un côté, j'obtiens toujours des cultures spirochétiennes, de l'autre côté des cultures de b. fusiformes.

J'ajouterai que l'aspect des b. fusiformes observés dans les différents milieux et aux diverses phases de leur développement est semblable à celui qui a été déjà décrit par tous les

auteurs, soit dans les processus morbides les plus différents, soit dans la cavité buccale saine, soit dans leurs cultures plus ou moins impures. Ils se présentent, donc, comme des bâtonnets plus ou moins longs, renflés à la partie médiane, à extrémités graduellement effilées. Dans quelques préparations, spécialement dans celles faites avec des cultures en gélatine, ils ressemblent à de petits vers de terre. Les individus courts sont droits; souvent ils sont réunis deux par deux et ressemblent ainsi à des diplocoques lancéolés ou à des fuseaux doubles. Certains, plus longs, sont courbés, ondulés, en S. Souvent ils présentent une forme filamenteuse, ondulée, tortueuse et constituent de vrais feutres microbiens. Ils ne prennent pas le Gram. A la partie médiane, souvent très renflée, on observe fréquemment des vacuoles incolores ou des granulations chromatiques.

J'ajouterai enfin que les cultures, soit des spirochètes, soit des *b. fusiformes*, dans les milieux solides aussi bien que dans les milieux liquides, ne dégagent aucune odeur, pas même les vieilles cultures qui se sont développées dans le sang et dans les milieux de Tarozzi, c'est-à-dire en présence de liquides albumineux et de fragments d'organes frais qui restent ensuite enveloppés par la riche végétation microbienne.

Il faut noter cette circonstance, car beaucoup d'auteurs ont signalé une odeur plus ou moins fétide exhalée par les cultures — évidemment impures — de spirochètes ou de *b. fusiformes*. On sait, du reste, que les cultures des spirochètes de la syphilis, que l'angine de Vincent, les ulcères phagédéniques de nature syphilitique, ne dégagent aucune mauvaise odeur.

Même Bezançon et Etchegoin (1), dans la plupart de leurs cultures — impures, mais riches en spirochètes pulmonaires — ont noté l'absence de cette odeur fétide, considérée par quelques auteurs comme caractéristique de ces microbes.

En ce qui concerne la mobilité des *b. fusiformes*, les opinions sont encore discordantes. D'un côté, on affirme qu'ils sont mobiles, de l'autre côté on soutient qu'ils sont immobiles. Rodella (2) dit, qu'à l'égard des caractères morphologiques de

(1) Bactériologie de la gangrène pulmonaire. *Bull. de l'Acad. de Médecine*, 8 mars 1927, p. 300.

(2) Über anaërobe Mundbakterien und ihre Bedeutung. *Archiv f. Hygiene*, 53, 1905, p. 329.

ces microorganismes, le point le plus débattu a toujours été celui de leur mobilité.

Les observations que j'ai faites à l'ultra-microscope, avec des cultures pures de *b. fusiformes* sur milieux de Tarozzi, ont permis d'éclaircir non seulement ce doute — qui, au fond, n'a qu'une valeur bien médiocre — mais encore la nature véritable de ces microbes et leurs rapports phylogéniques avec les spirochètes.

Ces rapports, entrevus depuis quelque temps déjà, admis par les uns, niés par les autres, apparaissent désormais évidents et d'une explication bien facile.

b) L'EXAMEN EN CHAMP OBSCUR RÉVÈLE LES ORIGINES
DES IMAGES FUSIFORMES.

Si l'on examine à l'ultra-microscope une culture encore jeune, c'est-à-dire de trois à quatre jours, de *b. fusiformes* développés sur milieu de Tarozzi, on voit ces microbes sous des aspects divers. On observe en effet des formes *courtes*, *moyennes* et *longues*.

Les *formes courtes* ressemblent à des bactéries communes ou à de petites outres, douées de mouvements très vifs. Elles traversent le champ obscur avec beaucoup de rapidité, se déplacent et évoluent avec une agilité extrême suivant toutes les directions, comme de petits poissons. Elles possèdent certainement un organe locomoteur, car on les voit parfois rester attachées ensemble, au nombre de deux ou plus, par leurs extrémités respectives — évidemment munies d'un cil — et s'entortiller réciproquement. On assiste alors à la scène très bizarre de leurs contorsions et de leurs efforts tenaces pour se dégager de l'entrelacement qui les emprisonne; on les voit s'agiter vivement et nager dans tous les sens. Quelquefois elles réussissent à se délivrer complètement et à se mouvoir de façon autonome.

Les *formes moyennes* se montrent déjà moins agiles, se déplacent lentement ou sont même complètement immobiles. Elles tendent vers la forme fuselée et, à la partie médiane, qui est plus large, présentent des granulations très réfringentes. Souvent ces formes ont l'aspect de fuseaux accouplés. Mais cet aspect de diplo-fuseau, bien connu et caractéristique, que les

b. fusiformes acquièrent même dans les frottis colorés, n'est que la conséquence d'une illusion d'optique. En examinant avec plus d'attention ces diplo-fuseaux, on voit qu'ils résultent de la torsion médiane, partielle ou totale, de l'axe de la bactérie. Si on observe donc le microbe de profil, on aura sous les yeux la forme d'une aile hélicoïdale double d'aéroplane.

Il a été dit plus haut que les spirochètes se montrent, à l'ultra-microscope, comme de grêles rubans entortillés. Les diplo-fuseaux constituent précisément ces rubans de longueur moyenne, qui présentent une seule torsion plus ou moins complète, à leur partie médiane. Dans les frottis colorés, ils ressemblent à de petits vers ayant leur corps étranglé en un point seulement ou même en divers endroits (fig. 1).

Le phénomène que nous venons de décrire ressort encore plus nettement à l'examen, sur fond noir, des *formes longues*. Ces dernières aussi sont plus ou moins mobiles. Elles se déplacent le plus souvent comme de petites anguilles, parfois avec une grande lenteur, quelquefois, au contraire, avec assez de rapidité. Leur corps peut présenter des mouvements vermiculaires ondulés. D'autres fois, elles exécutent d'élégantes évolutions et présentent des mouvements saccadés, ou de torsion ou d'entortillement sur leur axe et cela rappelle très bien le mouvement caractéristique des spirochètes.

Mais, dans les formes en fuseau, les tours de spire ne sont ni complets, ni très rapprochés comme dans les spirochètes. Dans les b. fusiformes ces tours se manifestent seulement en 2, 3 ou 4 points également distants l'un de l'autre, le long de l'axe imaginaire du ruban bactérien. Il en résulte alors une figure qui rappelle trois ou quatre fuseaux réunis en file, et qui semblent attachés l'un à l'autre par leur extrémité respective effilée. Effectivement, il s'agit d'un unique ruban bactérien, plus ou moins recroquevillé au lieu d'être spiralé, en deux ou trois points. Et très probablement la multiplication de ces microbes, devenus adultes, s'effectue par une séparation complète qui aurait lieu au niveau de ces points de torsion. Il n'est pas rare en effet d'observer, dans le champ obscur, une série de 3, 4, 5 éléments en fuseau, qui semblent unis en file par leurs extrémités respectives et qui offrent l'aspect d'une trainée de nacelles minuscules ou de petites saucisses liées l'une à l'autre

Ces formations sont le plus souvent immobiles, mais on peut aussi les voir se déplacer dans diverses directions et, parfois, présenter des mouvements désordonnés.

Dans certains cas, l'élément qui est à la tête de la file se met en mouvement et traîne les autres, qui le suivent passivement, à la remorque, d'une extrémité à l'autre du champ obscur. Parfois encore l'élément qui se trouve à la tête commence à se mouvoir brusquement et à vibrer avec énergie, comme pour rompre le lien qui l'unit aux éléments situés en arrière et pour acquérir ainsi son individualité et son autonomie de mouvement. Il semble que le lien, qui l'attache à la série, se soit transformé en un grêle flagellum destiné à devenir toujours plus mince et à s'allonger toujours plus, jusqu'à son déchirement final.

On peut quelquefois observer des diplo-fuseaux qui sont unis ensemble par un filament très long.

Parfois, la fuso-bactérie qui est en tête ne se maintient plus en ligne et forme un angle, plus ou moins aigu, avec l'axe de la chaîne. Assez souvent elle est le siège d'une vive agitation et de mouvements brusques, comme si le bon moment était arrivé pour se rendre finalement libre.

Tout cela correspond parfaitement à nos connaissances sur la multiplication des spirochètes. Même ces derniers présentent leurs extrémités effilées, à une certaine phase de leur développement. Et cela relève du fait qu'ils se multiplient par division transversale, et cette division est précédée par l'allongement et l'amincissement des points où la séparation doit avoir lieu. Alors les nouveaux spirochètes qui se forment montreront pendant quelque temps leurs extrémités effilées.

Il était donc naturel de constater un phénomène analogue dans la division des *b. fusiformes*.

En somme, la structure des microbes en fuseau, observés sur fond noir, conduit à considérer ces derniers comme des spirochètes — c'est-à-dire des bactéries en ruban — qui ont perdu la propriété de rester entortillés en spirale. Ils auraient acquis, au contraire, une forme linéaire banale. Seulement quand ils sont bien développés, ils effectuent des mouvements de torsion qui rappellent la tendance atavique à s'entortiller en hélice sur l'axe médian.

Pour désigner cette tendance par une expression compréhensive et aussi pour rendre hommage au professeur H. Vincent — qui depuis de longues années a consacré beaucoup de recherches d'une importance fondamentale au sujet qui nous occupe — je propose de nommer cette souche microbienne : *Héliconema « Vincenti »* (de ἑλῖξ = spire et νέμωι = rubans).

Il faut noter que les formes courtes, agiles, douées de mouvements très rapides, et qui ressemblent à une bactérie ordinaire, sont tout à fait identiques dans les spirochètes et dans les b. fusiformes. Au début de leur développement tous ces microbes se présentent comme de petites bactéries en fuseau, dans lesquelles on réussit à déceler, avec difficulté, un cil très grêle, unique, assez long. Dans les formes adultes on n'a pu, au contraire, observer aucun cil.

Au fur et à mesure que les cultures vieillissent, c'est-à-dire vers le cinquième ou le sixième jour, mais, souvent, beaucoup plus tôt, les b. fusiformes se transforment — comme il a été dit plus haut — en granulations de dimensions variables. En champ obscur, parmi les corps sphéroïdes qui ressemblent à de très petites amibes, à bords nets et renfermant au centre un petit granule très réfringent, on voit encore de rares b. fusiformes survivants, longs, déjà adultes. Mais leurs mouvements sont paresseux, lents ou manquent complètement. Parfois, ils sont agités de très légers mouvements vibratoires, qui rappellent des secousses fibrillaires et que l'on doit peut-être interpréter comme des signes d'une fin prochaine.

c) ACTION DES B. FUSIFORMES CHEZ LES ANIMAUX ET BESOINS RESPIRATOIRES.

Les injections de cultures de la souche fusiforme dans le péritoine des cobayes donnent les mêmes résultats que celles de cultures de la souche spirochétienne.

Les petites doses sont inoffensives ; les doses massives tuent en quelques heures et à l'autopsie on rencontre le tableau d'une gastro-entérite par élimination toxique.

Les injections intraveineuses tuent presque immédiatement, ou en six à huit heures. Dans ces cas, on constate un fait curieux.

Si l'on pratique avec du contenu péritonéal, du sang, ou de la pulpe d'organes des animaux qui ont succombé, des repiquages en bouillon de Tarozzi, on obtient, au bout de quarante-huit heures, de luxuriantes cultures mixtes, fuso-spirochètiennes. Donc les spirochètes font leur réapparition parmi les *b. fusiformes*, et cela démontre qu'un seul et simple passage de la souche fusiforme à travers l'organisme animal suffit pour lui faire recouvrer, en partie, la tendance originelle à se recroqueviller, c'est-à-dire à acquérir la forme spiralee.

D'ailleurs, il s'agit d'un phénomène bien connu en bactériologie. On sait que dans le monde des microbes on assiste à la fois à des variations ascendantes et à des variations descendantes.

Ces dernières peuvent s'effectuer même spontanément, quand un microbe doit vivre longtemps dans des conditions dysgénésiques, ou doit subir l'action de facteurs nuisibles (chaleur, sécheresse, lumière, oxygène, antiseptiques, etc.). Les variations ascendantes sont plus difficiles à obtenir, mais on sait que, pour certains microbes, le simple passage à travers un organisme animal réussit à revivifier une fonction chimique (chromogène, enzymatique, toxigène, etc.) auparavant disparue.

J'ai observé, parfois, que les injections de cultures de *b. fusiformes*, aussi bien que de spirochètes, sous la peau du pavillon de l'oreille des lapins, déterminent des formations nodulaires caséeuses et de petites eschares nécrotiques, qui, dans certains cas, donnent lieu à des érosions plus ou moins étendues du pavillon, avec perte de substance.

Jusqu'à présent on a généralement admis que ces Héliconèmes se comportent comme des microbes plutôt anaérobies. En effet, dans les cultures, ils se développent de préférence, plutôt à l'abri de l'oxygène atmosphérique. Comme je l'ai déjà dit dans mon précédent mémoire, leur besoin d'oxygène est révélé par la disposition du voile superficiel, qui, dans les tubes de gélatine, se forme immédiatement au-dessous de la couche d'huile de vaseline. Le voile tend, en effet, à grimper le long des parois, entre le verre et la colonne d'huile, comme pour aller à la rencontre de l'oxygène atmosphérique.

Mais on peut aussi calculer, d'une manière approximative, quel degré de tension de cet oxygène est le plus convenable pour les Héliconèmes.

J'ai voulu contrôler l'affirmation de certains auteurs, d'après lesquels le *b. fusiforme* serait capable de produire des gaz dans les tubes de gélose glucosée. Dans ce but j'ai pratiqué des ensemencements abondants, par piqûre, de spirochètes et de *b. fusiformes*, dans des tubes de gélose (droits) glucosée à 2 p. 100 ou additionnée, à un tiers, de sérum de cheval ou de liquide ascitique. Dans la gélose-sérum et dans la gélose glucosée, les *b. fusiformes* ensemencés en surface se développent seulement à une certaine profondeur et s'enfoncent dans le milieu en y formant un feutre dense (fig. 23 et 24), dont les éléments filamenteux acquièrent un véritable aspect mycélien extrêmement caractéristique.

Pour réaliser de bonnes conditions d'anaérobiose j'avais versé, à la surface du milieu ensemencé, une couche de deux centimètres de gélose ordinaire liquéfiée. J'avais placé ensuite les cultures dans l'étuve à 37°.

Au début, pendant cinq ou six jours, je n'ai observé aucune trace de développement des cultures, pas même le long de la piqûre, ni aucune trace de production de gaz. Le cylindre de gélose se montrait entièrement homogène et transparent. Mais, vers le huitième jour, j'ai constaté l'apparition d'une opacité au niveau de la couche superficielle de la gélose. L'examen microscopique révéla que cette opacité, qui d'ailleurs avait fait son apparition dans tous les tubes, était constitué par un feutre mycélien dense de très beaux spirochètes ou de bacilles fusiformes typiques.

En examinant encore plus attentivement les cylindres de gélose, j'ai pu constater qu'ils se présentaient parfaitement transparents et, d'après les apparences, stériles, depuis le fond jusqu'à proximité de la concavité supérieure. A une distance de 1 millimètre environ de la surface externe, on observait une sorte de constellation zonale, constituée par d'innombrables granulations brunâtres, qui représentaient autant de colonies de spirochètes ou de *b. fusiformes*.

La couche de gélose qui se trouvait au-dessus se montrait



FIG. A.

simplement opaque et les microbes s'y trouvaient uniformément disséminés, bien que plus rares (fig. A).

Une telle constatation démontre que ces microorganismes ne donnent pas lieu à la formation de gaz et, en même temps, qu'ils ne sont pas de véritables anaérobies. Il apparaît, au contraire, qu'ils ont besoin de se trouver à peu de distance de l'air atmosphérique. Pour aller à la rencontre de cette dernière, ils s'étaient élevés, de la profondeur où on les avait introduits avec l'anse de platine, et ils avaient traversé, par leurs propres moyens, une épaisseur de 2 centimètres du cylindre compact de gélose stérile versée immédiatement sur le milieuensemencé. Enfin, ils s'étaient placés, d'une façon régulière et presque géométrique, à une distance convenable de l'air extérieur.

Il faut remarquer que, dans les tubesensemencés avec les spirochètes, on obtint, en surface, une culture des spirochètes proprement dits ; dans les tubesensemencés avec les b. fusiformes, on obtint, dans les couches superficielles, seulement des bacilles fusiformes.

La façon dont se comportent les Héliconèmes dans les divers milieux nutritifs fait poser la question de leur position systématique en microbiologie. L'apparition de formes en fuseau, en massue, sphéroïdes, nodulaires, mycéliennes, devrait faire rapprocher les Héliconèmes des *fungi imperfecti* qui, du côté systématique, sont aux confins des protophytes, des hyphomycètes et des bactéries. En outre, les rapports, que nous avons mis en évidence entre les formes en spirale et les formes en fuseau, donnent l'explication de plusieurs autres points restés jusqu'aujourd'hui obscurs et toujours débattus. Ces points concernent l'interprétation du double aspect sous lequel un seul et même microbe se montre dans les différents processus pathologiques caractérisés par la présence simultanée des deux formes microbiennes.

Ainsi, on croit en général que les exsudats diphtéroïdes relèvent du b. fusiforme, tandis que le spirochète jouerait un rôle spécifique dans les processus ulcéreux (1). Maints auteurs croient que les spirochètes exaltent la virulence des b. fusi-

(1) DORTER et SACQUÉPÉE. *Précis de Bactériologie*, Paris, 1921, p. 739.

formes (1). En effet, les cas d'angine ulcéro-membraneuse, caractérisés par la seule présence des b. fusiformes, se montreraient cliniquement moins graves que les cas où l'on constate l'association des deux formes microbiennes.

D'autres auteurs pensent, au contraire, que l'agent pathogène est toujours le b. fusiforme, tandis que le spirochète aurait pour fonction de préparer le terrain à l'invasion du microbe associé (2). En effet, Meyer (3), qui a étudié histologiquement les processus caractérisés par l'association dite fusospirochétienne, a observé que, dans les couches les plus profondes des lésions, au niveau de la zone qui borne le tissu vivant et sain, prédominent presque seuls les spirochètes, tandis que les fusiformes se montreraient plus abondants dans les couches plus superficielles et nécrosées, conjointement avec d'autres microorganismes. Vincent (4) et Reiche (5) partagent cette opinion, en admettant que les spirochètes favorisent le développement en surface des b. fusiformes.

Au contraire, beaucoup d'auteurs n'attribuent aucune action spécifique soit aux b. fusiformes, soit aux spirochètes, d'autant plus que l'on rencontre souvent les deux espèces microbiennes dans les cryptes des amygdales normales, dans le mucus nasal, le tartre dentaire, la salive, etc.

Chamberlain (6), qui a pu observer des spirochètes et des b. fusiformes dans 116 cas de processus morbides divers, de la bouche et de l'arrière-bouche, révoque en doute l'importance étiologique de ces microbes.

(1) WEAVER et TUNNICLIFF, The occurrence of fusiform bacilli and spirilla in connection with morbid processes. *The Journ. of Inf. Dis.*, 2, 1905, p. 446.

(2) MÜHLENS, dans *Handb. der path. Mikroorg.* [von KOLLE et WASSERMANN. Iéna, 7, 1913, p. 921; ONORATO, Sur le phagédénisme à symbiose spiro-bacillaire. *Bull. de la Soc. de Path. exotique*, 9 févr. 1927.

(3) Angina ulcero-membranosa sive necrotica und ihre Erreger. VOLKMANN'S Sammlung kl. Vorträge. Chirurgie, n. 137-138. Leipzig, 1908.

(4) *Loc. cit.* Ces *Annales*, 1896, p. 496 et 1899, p. 615.

(5) Laryngitis membrano-ulcerosa fuso-bacillaris. *Münch. med. Woch.*, 1907, 17.

(6) The occurrence in the Philippines of associated spirochaetae und fusiform bacilli, etc. *Philippine Journ. of Sc.*, déc. 1911.

III. — Considérations sur les prétendus bacilles fusiformes cultivés ou isolés jusqu'à présent.

En effet, le bacille fusiforme qui, en raison de son aspect, avait été désigné par Seitz (1) sous le nom de *Bacillus hastilis* (ἄστυ = lance), a désormais une longue histoire et quelque peu confuse.

Fort nombreux sont les auteurs qui, depuis longtemps, ont prétendu l'avoir isolé en culture pure.

Si on tient compte des caractères principaux des Hélicobactéries, je pense qu'il me sera aisé de réduire à néant les affirmations des auteurs.

Dès 1890, Miller (2) avait décrit des bacilles en fuseau ou en aiguille et les avait rencontrés même dans la bouche saine. Successivement Babès (3), Rauchfuss (4), Plaut (5), Stooss (6) les ont constatés plusieurs fois dans des cas d'angine et de scorbut; Verneuil et Clado (7) dans un abcès sous-lingual, Veillon et Zuber (8) dans des cas d'appendicite, etc. Mais spécialement après les travaux fondamentaux de Vincent (1899) sur les « angines à bacilles fusiformes », nombre d'auteurs ont attiré l'attention générale sur ces formes bactériennes singulières, observées dans des stomatites diverses, dans plusieurs processus gangréneux de la cavité buccale, dans l'angine ou dans des processus anginoïdes, dans le noma, les ulcères phagédéniques, la gangrène pulmonaire, etc. et le plus souvent

(1) Ueber den *Bacillus hastilis*. *Zeitschr. f. Hygiene*, 30, 1899, p. 47.

(2) Die Bedeutung der Mikroorganismen der Mundhöhle für den menschlichen Organismus. *Prager med. Woch.*, n. 33, 1890, p. 475.

(3) Ueber einen Gengivitis und Hämorrhagien verursachenden *Bacillus* bei Skorbut. *Deutsche med. Woch.*, n. 43, 1893, p. 1035.

(4) MAYER, Affections of the mouth and throat associated with the fusiform bacillus and spirillum of Vincent. *Amer. Journ. of med. Sc.*, 123, 1902, p. 187.

(5) Studien zur bakteriellen Diagnostik d. Diphterie u. d. Anginen. *Deutsche med. Woch.*, n° 49, 1894, p. 920.

(6) Zur Aetiologie und Pathologie der Anginen, des Stomatitis aphtosa und des Soores. *Mitt. aus. d. klinik. u. med. Inst. d. Schweiz*, 3^e série, n. 1, 1895, voir : *Centr. f. Bakt., Origin.*, 19, 1896, p. 237.

(7) Abcès spirillaires. *C. R. de l'Ac. des Sciences*, 108, 1889, p. 272.

(8) Recherches sur quelques microbes strictement aérobies et leur rôle en pathologie. *Arch. de Méd. exp. et d'Anat. path.*, n° 4, 1894, p. 517.

associées à leurs inséparables satellites ou « symbiotes » : les spirochètes.

Dans sa monographie sur les bacilles fusiformes, insérée dans la première édition du Traité publié par Kolle et Wassermann, Babès (1) a revendiqué la priorité d'un prétendu isolement du b. fusiforme, qu'il aurait obtenu dès 1883 de lésions de scorbut. Mais de la description qu'il en fait il ressort clairement que les cultures de ce soi-disant b. fusiforme étaient contaminées par des streptocoques. Et, en effet, les inoculations chez les animaux (lapins et souris) provoquèrent des œdèmes, des hémorragies, des abcès et la mort en peu de jours. A l'autopsie on ne put jamais rencontrer le b. fusiforme, et Babès avança l'hypothèse que ce microbe agissait par ses toxines puissantes, comme les agents du tétanos et de la diphtérie.

Mais ce qui démontre que Babès n'a jamais obtenu ni des cultures pures, ni des cultures impures de bacilles fusiformes authentiques, est qu'il n'a jamais signalé dans les cultures la présence des corps coccoïdes ou sphéroïdes caractéristiques. Ces formations singulières n'auraient pu échapper à son attention.

D'ailleurs, nous avons déjà dit que les inoculations des cultures pures de b. fusiformes chez les animaux de laboratoire ne déterminent ni abcès, ni hémorragies; elles ne produisent pas davantage d'infections mortelles. Ajoutons encore que les résultats d'expériences faites avec un matériel impur ou avec des cultures mixtes ne peuvent être considérés comme démonstratifs.

Les auteurs qui, depuis les travaux de Vincent, ont affirmé d'avoir cultivé les bacilles fusiformes, constituent aujourd'hui une véritable légion.

D'après Beitzke (2) qui, dans un exposé complet de la question, cite les publications de 113 auteurs, jusqu'en 1904, tous ces chercheurs travaillèrent avec des cultures très impures — aérobies ou anaérobies — dégageant des odeurs et des gaz fétides; inoculées aux animaux, celles-ci provoquaient des abcès à contenu nauséabond.

(1) Spindelförmige Bacillen, dans *Handbuch der path. Mikroorganismen*, 1906, *Ergänzungsband*, 1^{re} partie, p. 271.

(2) Ueber die fusiformen Bacillen. *Centr. f. Bakt.*, 1904, *Ref.* 35, p. 1.

Même les travaux publiés successivement, jusqu'en 1910, semblent, à ce point de vue, bien peu démonstratifs. Baumgartner aussi l'affirme. Cet auteur, dans un beau mémoire publié à cette époque (1), dit que toutes les cultures de bacilles fusiformes, considérées comme pures par les auteurs, ne sont absolument pas dans cette condition.

On pourrait donc négliger ces travaux, d'autant plus qu'une analyse soignée des publications qui ont paru dans les vingt dernières années nous conduit à partager l'opinion de Baumgartner. Mais il importe de mentionner ici les travaux de ces auteurs, encore fréquemment cités actuellement, à propos de cultures pures de *b. fusiformes*.

Ainsi, les prétendus *b. fusiformes* de Kaspar et Kern (2), isolés du pus d'abcès hépatiques, pulmonaires, spléniques et d'un phlegmon de la paroi gastrique, étaient des microbes qui produisaient des gaz fétides, de l'indol, etc. Nous savons que ces propriétés ne sont pas caractéristiques des cultures pures d'hélicônèmes.

De même les prétendus *b. fusiformes* qu'Ellermann (3) cultiva sur sérum-gélose et qui provenaient d'une angine ulcéreuse et d'une stomatite gangréneuse, exhalaient une odeur nauséabonde. Ces bacilles d'Ellermann ne présentaient pas le renflement caractéristique des fusiformes et se montraient, en outre, immobiles. Dans une note ultérieure (4), le même auteur affirme avoir réussi à cultiver de nouveau en culture pure le *b. fusiforme*, en se servant du contenu d'un abcès fétide qu'il avait provoqué chez un lapin par inoculation de tissu nécrosé d'une angine ulcéreuse. Mais ces cultures, aussi, dégageaient une mauvaise odeur et formaient des bulles de gaz; les bacilles restaient immobiles et, inoculés sous la peau d'un lapin ils provoquèrent un abcès dans le contenu duquel on observa les mêmes formes bactériennes qui avaient servi pour l'inoculation.

Dans une troisième note parue quelques années plus tard,

(1) Die tierischen und anaëroben pflanzlichen Protisten der Mundhöhle des Menschen. *Ergebn. d. ges. Zahnheilkunde*, n° 2, 1910.

(2) Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen. *Centr. f. Bakt.*, 55, 1910, *Orig.*, p. 97.

(3) Ueber die Kultur der fusiformen Bacillen. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 37, 1904, p. 729.

(4) Einige Fälle von bakteriellen Nekrose beim Menschen. *Centralbl. f. Bakt., Orig.*, 38, 1905, p. 383.

Ellermann affirma (1) avoir isolé en anaérobiose, sur gélose-ascite, le b. fusiforme. Mais ici encore, ces nouveaux bacilles immobiles, qui se développaient seulement dans des milieux contenant du sérum, qui provoquaient parfois des abcès sous la peau des animaux et qui exhalaient une odeur si mauvaise qu'Ellermann supposa que le *fætor oris* était causé par leur présence dans la cavité buccale, n'étaient certainement pas des héliconèmes sphériques.

Presque en même temps qu'Ellermann, Veszprémi (2) annonça qu'il avait réussi — en employant des liquides albumineux divers — à isoler des bacilles fusiformes en culture pure ; ces bacilles provenaient du contenu d'un abcès qui s'était développé chez un lapin inoculé sous la peau avec de la substance purulente. Mais ces cultures dégageaient une odeur de gangrène fétide et, inoculées aux lapins, déterminaient des abcès gangréneux et mortels d'une odeur repoussante.

Or, nous savons, depuis les premiers travaux de Vincent sur la pourriture d'hôpital, que l'inoculation sous-cutanée, chez le lapin et aussi chez l'homme, de la substance putride elle-même des ulcères phagédéniques pullulants de bacilles fusiformes, n'est pas capable de provoquer un processus morbide quelconque, soit suppuré, soit gangréneux.

Evidemment, comme l'a remarqué Mühlens (3), dans les cultures de Veszprémi se multipliaient diverses sortes de microbes.

Rodella aussi (4), dans étude que nous avons déjà mentionnée, affirma avoir isolé le bacille fusiforme. Mais le microbe de Rodella formait des spores et dégageait, dans les cultures en bouillon, un gaz de mauvaise odeur.

Dans des travaux parus peu après, Mühlens (5) a longuement étudié les spirochètes et les b. fusiformes de la bouche. Il aurait

(1) Zur Kenntnis der Spindelbazillen. *Zeitschr. f. Hygiene*, 56, 1907, p. 453.

(2) Kultur und Tierversuche mit dem Bacillus fusiformis und dem Spirillum. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 38, 1905, p. 136.

(3) Andere, zum Theil als pathogen geltende Spirochäten. Dans KOLLE et WASSERMANN, *Handb. d. path. Mikroorganismen*. Léna, 7, 1913, p. 921.

(4) *Loc. cit.*

(5) Ueber Züchtung von Zahnspirochäten und fusiform Bacillen auf künstlichem (festen) Nährboden. *Deut. med. Woch.*, 1906, p. 797, et MÜHLENS et HARTMANN, Ueber Bacillus fusiformis und Spirochaeta dentium. *Zeitschr. f. Hygiene*, 55, 1906, p. 81.

réussi à obtenir, dans des milieux contenant du sérum, des cultures pures de *b. fusiformes* et, à l'intérieur de ces microbes, il aurait même constaté des noyaux qui se multipliaient par division indirecte, jusqu'à se partager en huit.

Mais, jusqu'à ce jour, personne n'a pu démontrer la présence de noyaux dans les *b. fusiformes*. En outre, Mühlens lui-même dit que ses cultures étaient identiques à celles d'Ellermann et nous savons que la pureté et l'authenticité de ces dernières ont été toujours contestées. Enfin, les cultures de Mühlens exhalaient une puanteur si repoussante, analogue à celle des dents cariées, des pieds en sueur, de la putréfaction, etc., que leur étude était même devenue fastidieuse pour l'auteur. Mühlens, ensuite, ne fait aucune mention de corps sphéroïdes qui, au cours de 14 générations successives de *b. fusiformes* qu'il avait obtenues, auraient bien dû attirer quelquefois son attention.

Il est assez probable que Mühlens lui-même ait révoqué en doute, plus tard, la pureté et l'authenticité de ses cultures de *b. fusiformes*, car, dans un article monographique sur les spirochètes, il dit : « En ce qui concerne la morphologie et la biologie des *b. fusiformes*, les opinions ne sont encore ni claires, ni concordantes. Les nombreuses conceptions sur la morphologie, la mobilité, les caractères des cultures et l'action pathogène de ces microbes sont, au contraire, très discordantes (1). »

Même les recherches de Weaver et Ruth Tunnicliff (2), que je vois souvent citées, ne peuvent être considérées comme concluantes.

Malheureusement quelques auteurs, lorsqu'ils parlent de spirochètes et de bacilles fusiformes, emploient indifféremment, comme s'il s'agissait de termes équivalents, les mots *cultivé* et *isolé*. Et comme, effectivement, il s'agit de microbes difficiles à isoler en culture pure, mais relativement faciles à cultiver en cultures impures, on comprend bien que les deux expressions citées, employées sans beaucoup de précision, donnent lieu à des incertitudes et à des malentendus. Dans mon précédent mémoire, j'en ai relaté un exemple typique à propos

(1) *Loc. cit.*, dans *Handb. d. path. Mikroorganismen*. Iéna, 7, 1913, p. 927.

(2) The occurrence of fusiform bacilli and spirilli in connection with morbid processes. *The Journ. of inf. diseases*, 2, 1905, p. 446 et 3, 1906, p. 148.

du prétendu isolement des spirochètes intestinaux, attribué à M^{me} Hogue, et qui a induit en erreur quelques auteurs. Ainsi Weaver et Tunnicliff ont cru avoir isolé et cultivé en anaérobiose, sur gélose-ascite, le bacille fusiforme. Les colonies étaient d'une couleur blanchâtre, semblables à celles des streptocoques; elles produisaient des gaz dans la gélose glucosée et exhalaient une odeur désagréable. Dans ces prétendus bacilles fusiformes, les auteurs auraient même découvert des spores, qui se coloraient si fortement par la fuchsine phéniquée que leur décoloration n'avait pas lieu, même en employant l'acide sulfurique à 1 p. 100. M^{me} Tunnicliff aurait aussi réussi à observer la germination de ces spores, qui donnaient des bacilles trapus. Ces quelques faits suffisent pour faire comprendre de suite que ces bacilles ne peuvent absolument pas être identifiés avec les bacilles fusiformes authentiques, c'est-à-dire avec la souche des Héliconèmes Vincenti. Mühlens aussi partage la même opinion (1).

A cette époque, très riche en publications sur les bacilles fusiformes, Lewkowicz (2) affirma, lui aussi, avoir réussi à isoler à l'état de pureté, de la cavité buccale, les bacilles fusiformes au moyen de cultures rigoureusement protégées du contact de l'air et contenant du liquide ascitique. Mais les bacilles de cet auteur, qui revendique la priorité de l'isolement en culture pure du fuso-bacille, se développaient seulement dans les couches profondes du milieu, dégageaient une odeur nauséabonde, étaient immobiles et tuaient les animaux de laboratoire par inoculation sous-cutanée.

Peu après, Leiner (3) annonça d'avoir isolé, de quelques cas de diphtérie septique, un microbe anaérobie, très semblable au bacille fusiforme et qui se développait en petites colonies grises sur la gélose glucosée. Mais ce microbe de Leiner était immobile, acidifiait les milieux lactosés au tournesol, ne se développait ni dans la gélatine simple à 37°, ni dans l'eau pep-

(1) *Loc. cit.* : *Handbuch der Mikroorg.*, Iéna, 1913, 7, p. 924.

(2) Sur les cultures pures du fuso-bacille, agent infectieux des inflammations suppurées de la cavité buccale. *Przegląd lekarski*, 1903, p. 197. Analysé dans *Bull. de l'Inst. Past.*, 1903, p. 825. En outre : Ueber die Reinkulturen des fusiformen Bacillus. *Centr. f. Bakter., Orig.*, 41, 1896, p. 153.

(3) Ueber anaérobe Bakterien bei Diphterie. *Centr. f. Bakter., Orig.*, 43, 1907, p. 7 et 119.

tonée, ni dans des milieux sans albumine et, enfin, dans toutes ses cultures exhalait une odeur extrêmement fétide.

A vrai dire, Leiner lui-même admet que ses bacilles fusiformes n'ont rien de commun avec les bacilles fusiformes de Vincent.

Plus tard, Repaci (1) isola de la bouche un bacille en fuseau, immobile, rigoureusement anaérobie et qui formait des colonies grisâtres, opaques, dans la gélose glucosée. Mais ce microbe, lui aussi, attaquait les sucres, formait de l'indol dans le bouillon peptoné et, dans les milieux liquides, dégageait une odeur insupportable. Enfin, il tuait les cobayes et les rats.

Dans une note ultérieure (2), le même auteur affirma avoir isolé le vrai bacille de Vincent d'une pseudo-membrane d'un cas typique d'angine. Les colonies de ce bacille étaient d'un blanc sale, avec un centre gris, et dégageaient une odeur désagréable de colle forte ou de putréfaction. Cependant, Repaci admet que, parmi les nombreux microbes qui constituent la flore bactérienne buccale, on peut en rencontrer plusieurs variétés ayant un aspect en fuseau.

Presque à la même époque, Ghon et Mucha (3) isolèrent, du pus d'un abcès cérébral, un bacille fusiforme qui se développait facilement le long de la piqûre dans les tubes de gélose additionnés de glucose et de sérum et refroidis dans la position droite. Mais dans ces milieux le microbe formait de longs filaments; en outre, il coagulait le lait, était immobile, et dans les vieilles cultures exhalait une odeur quelque peu fétide.

Deux ans après, Costa (4) isola, lui aussi, un bacille fusiforme du mucus naso-pharyngien de cinq individus. Mais il s'agissait d'un microbe rigoureusement aérobie, qui se développait seulement en surface et ne troublait même pas le bouillon, se multiplait aussi sur la pomme de terre, liquéfiait la gélatine, n'attaquait pas les sucres, se montrait inoffensif

(1) Sur un bacille rappelant par ses caractères le *B. fusiforme* de Vincent. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 4, 1909, p. 591.

(2) Isolement et culture du bac. fusiforme de Vincent. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 4, 1909, p. 860.

(3) Beiträge zur Kenntnis der anaëroben Bakterien des Menschen. *Centr. f. Bakter., Orig.*, 69, 1909, p. 493.

(4) Sur un bacille fusiforme aérobie saprophyte de la cavité buccale. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 4, 1911, p. 814.

pour les animaux, etc. On ne peut donc nullement le comparer au vrai bacille fusiforme, d'origine héliconémienne.

D'un abcès cérébral, Klinger (1) isole un *Bacterium fusiforme*, grêle, en aiguille, anaérobie, mais qui se développait aussi dans les milieux ordinaires, même dans la gélatine commune et dégageait une odeur désagréable, avec production d'indol, d'hydrogène sulfuré, etc.

Osaki (2) isole de l'enduit dentaire d'un individu sain, un bacille grêle, filamenteux, ondulé, immobile, anaérobie, qui se développait même dans la gélose ordinaire, dans la gélatine commune, etc., et produisait de l'hydrogène sulfuré, de l'indol, etc., en dégageant une odeur extrêmement fétide.

Dans un travail très étudié et contenant la description minutieuse et prolixe de certaines méthodes extrêmement compliquées pour obtenir des cultures de *Spirochæta pallida*, Tohl Shmamine (3) affirme avoir obtenu des cultures pures de bacilles en aiguille et de b. fusiformes de Vincent.

Mais, examinés en champ obscur, ces microbes — que d'ailleurs Shmamine a décrits très imparfaitement — se montraient immobiles et, cultivés dans des milieux contenant des fragments de foie, exhalaient une mauvaise odeur. La souche en aiguille s'éteignit à la troisième génération.

En ensemençant du pus provenant d'un processus pyohémique mortel chez l'homme, Maresch (4) a pu cultiver, dans des milieux anaérobies, un bacille grêle, filamenteux, avec les extrémités effilées. Mais ce microbe qui, au fond des tubes de gélose, formait des colonies blanchâtres, était immobile, coagulait le lait et exhalait, lui aussi, une odeur fétide.

Dans ces derniers temps la littérature sur les b. fusiformes, déjà si riche, mais quelque peu confuse, signale encore deux

(1) Ueber einen neuen pathogenen Anaëroben aus menschlichen Eiter. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 62, 1912, p. 186.

(2) Zur Kenntnis der anaëroben Bakterien der Mundhöhle. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 62, 1912, p. 77.

(3) Über die Reinzüchtung der *Spirochæta pallida* und der nadelförmigen Bakterien aus syphilitischen Material, mit besonderer Berücksichtigung der Reinkultur von *Spirochæta dentium* und des *Bac. fusiformis* aus der Mundhöhle. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 65, 1912, p. 311.

(4) Zur Kenntnis der durch fusiforme Bacillen bedingten pyämischen Prozesse. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 87, 1916, p. 130.

travaux qui méritent de retenir l'attention : celui de Knorr et celui de Rukawischnikoff.

Les recherches de Knorr (1), effectuées à l'Institut d'Hygiène de Würzburg, auraient abouti à l'isolement de trois souches des prétendus *b. fusiformes* nommées par l'auteur « *fusobactéries* ». Mais, de la description de l'auteur, il ressort qu'il s'agissait de microbes immobiles, acidogènes, qui se multipliaient même dans les milieux à réaction acide et se développaient en surface, etc. Ils présentaient, en outre, dans les milieux liquides et même après quelques semaines de culture, des formes filamenteuses contenant des granulations Gram-positives.

Ces quelques données suffisent pour démontrer que les *fusobactéries* de Knorr ne présentent rien de commun avec les bacilles héliconémiens. Ajoutons que cet auteur, comme d'ailleurs tous les autres que nous avons précédemment cités, ne fait aucune mention de corps coccoïdes ou sphéroïdes, qui sont, au contraire, la caractéristique de toutes les cultures bien développées de la souche héliconémienne.

Le travail le plus récent sur les *b. fusiformes* est celui de Rukawischnikoff (2).

Cet auteur a étudié le développement des *b. fusiformes* et des spirochètes dans les produits pathologiques et dans des cultures très impures. Il affirme avoir obtenu ces dernières à la température du laboratoire — comme les cultures de Veillon — dans un milieu constitué par du sang mélangé à des produits de décomposition d'ulcères nécrotiques etensemencé avec des bouillies polymicrobiennes, provenant d'angines, de gingivites, de stomatites, etc.

Parmi les nombreuses observations, plus ou moins acceptables, que Rukawischnikoff a relatées dans son mémoire, il ne faut pas en oublier une, assez curieuse. Il aurait observé le développement de spirochètes et de *b. fusiformes* à l'intérieur du protoplasma des mononucléaires et des polynucléaires et même à l'intérieur de leurs noyaux.

(1) Ueber die fusospirilläre Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillum sputigenum*. II. Mitt. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 79, 1923, p. 4.

(2) Zur Biologie des *B. fusiformis* und der *Spirochaele vincenti*. *Centrbl. f. Bakt., Orig.*, 100, 1926, p. 218.

De cet exposé sommaire ressort donc une constatation évidente : jusqu'à présent, aucun auteur n'a pu établir, d'une manière irréfutable, qu'il avait isolé et étudié en cultures véritablement pures des *b. fusiformes* authentiques.

Pour ma part, je ne considère comme *b. fusiformes* authentiques que ceux qui ont des rapports d'origine avec la souche spirochétienne, c'est-à-dire qui sont capables de reproduire suivant les cas, en culture pure ou dans l'organisme animal, des figures typiques, en hélice ou en fuseau.

Il va sans dire que je n'entends nullement contester l'importance des résultats obtenus par les nombreux auteurs qui ont décrit et même isolé des fusobactéries ou des bacilles en aiguille. Sans aucun doute, la famille des bactéries plus ou moins anaérobies, qui dans les cultures acquièrent la forme fuselée, doit être extrêmement nombreuse.

« Sous le nom de *b. fusiformes* — dit Mühlens (1) — ont été décrits des microorganismes tout à fait différents les uns des autres. »

Peut-être, quelques auteurs ont-ils effectivement réussi à obtenir des cultures pures de bacilles en fuseau. Les reproductions microphotographiques et les figures qui accompagnent leurs mémoires correspondraient aux caractères morphologiques de ces microbes. Mais pas un de ces bacilles en fuseau, qui ont été jusqu'à ce jour isolés véritablement en culture pure, ne peut être identifié au microbe que nous avons décrit dans le présent mémoire et qui relève d'une origine spirochétienne.

Il ressort de notre revue que les caractères de toutes les fusobactéries jusqu'à présent étudiées, en cultures pures et en cultures impures, appartiennent à des espèces bien différentes des Héliconèmes. Aucun des auteurs que nous avons mentionnés n'a relevé la propriété la plus caractéristique et presque spécifique du bacille fusiforme, qui tire directement son origine du spirochète : c'est celle de se transformer précocement, dans les cultures, en granulations sphéroïdales, comme cela se produit avec les spirochètes.

Un tel phénomène n'aurait pu échapper à l'attention des bactériologistes. Il se manifeste, en effet, dans des proportions

(1) *Loc. cit.* : *Handbuch der path. Mikroorg.*, Iéna, 1913, 7, p. 927.

si massives que toute la culture, au cinquième ou sixième jour, et quelquefois dès les premières quarante-huit heures, se montre constituée par une agglomération serrée et comme zoogléique, de granulations, parmi lesquelles on réussit seulement avec beaucoup de peine à déceler quelques formes en fuseau ou spiralées.

Par conséquent, nous avons réussi à isoler en culture véritablement pure et à décrire, en ce qui concerne les caractères essentiels, morphologiques et biologiques, l'Héliconème Vincenti, c'est-à-dire un microbe capable de donner naissance à la fois, dans des conditions bien déterminées, à des formes spirochètiennes et à des formes en fuseau. En d'autres termes, il s'agit d'un microbe, duquel relèveraient ces images microscopiques que l'on a jusqu'aujourd'hui interprétées, à tort, comme des symbioses bactériennes.

Résumé.

1° L'emploi de milieux solides catalyseurs permet d'obtenir des cultures abondantes de spirochètes cœcaux et donne ainsi le moyen d'étudier plus complètement ces microbes et d'en rendre plus facile l'expérimentation sur les animaux.

2° Les spirochètes cœcaux, cultivés en gélatine à 37°, se montrent souvent avec un aspect nettement spirillaire, que l'on ne peut absolument pas différencier de celui des spirochètes buccaux, angineux, pulmonaires, etc.

3° Dans le bouillon ordinaire, le bacille de la pomme de terre (*B. mesentericus vulgatus*) exerce une action nettement favorisante sur le développement des spirochètes. Ces microbes,ensemencés seuls, avec l'anse, dans le bouillon ordinaire, ne s'y développent pas. Au contraire, dans les cultures mixtes en bouillon, de spirochètes et de b. méésentériques, ensemencées avec l'anse, les spirochètes se multiplient tout de suite et forment de très abondants amas filamenteux et spiralés, tout à fait caractéristiques.

4° L'action favorisante exercée sur le développement des spirochètes par le bacille de la pomme de terre est due aux produits du métabolisme de ce microbe. En effet, elle se mani-

forte aussi dans les vieilles cultures filtrées de *B. mesentericus*. Dans ces milieux, les spirochètes, au bout de quelques jours, se présentent sous l'aspect de bacilles fusiformes typiques. Le phénomène de cette transformation fusiforme des spirochètes, relèverait principalement de la présence de produits thermolabiles.

5° Les rapides transformations des spirochètes en b. fusiformes, obtenues dans les cultures en bouillon et filtrées de *B. mesentericus*, ne sont pas permanentes. Dans les repiquages successifs en eau peptonée, on observe que ces microbes recouvrent graduellement leur propriété primitive de se recroqueviller et se présentent ensuite, dans les cultures ultérieures, avec un aspect nettement spiralé.

6° Mais le contact prolongé de cultures spirochétiennes avec l'air atmosphérique fait apparaître, aux dépens de la souche spirochétienne, une souche fusiforme qui présente des caractères fixes. Dans ce cas, les microbes originels ont perdu la propriété de se recroqueviller autour de leur axe originaire et de présenter l'aspect spirochétiiforme. La souche microbienne issue des spirochètes se cultive dans les milieux solides et liquides, comme des bacilles fusiformes authentiques.

7° L'aspect des cultures, soit des spirochètes, soit des b. fusiformes, en milieux solides et en milieux liquides, est identique, et leurs propriétés biologiques sont également les mêmes. Le sérum des lapins immunisés au moyen des cultures vivantes de spirochètes agglutine, au même taux, les cultures de la souche spirochétienne, aussi bien que celles de la souche fusiforme.

8° Si l'on examine à l'ultra-microscope les phases de développement des b. fusiformes, on constate que l'aspect en fuseau sous lequel ils se présentent dans les frottis colorés est déterminé par des torsions le long du filament bactérien. Dans les formes adultes et allongées, ces torsions s'effectuent en un point, ou même en plusieurs endroits du ruban bactérien qui, alors, ressort sur le fond obscur comme une figure hélicoïdale. Les points de torsion se manifestent dans les endroits où, plus tard, aura lieu la division transversale du filament bactérien. Les bacilles fusiformes ne sont donc que des spirochètes qui, par suite de causes diverses (action de produits du métabolisme

d'autres microbes, action prolongée de l'oxygène atmosphérique), ont perdu, entièrement ou en partie, la propriété caractéristique d'effectuer une rotation hélicoïdale, complète et serrée, autour de leur axe. Pour ce motif, il semble logique de désigner cette espèce microbienne sous le nom de « *Heliconema Vincenti* ».

9° Ces notions nous expliquent pourquoi, dans les nombreuses manifestations morbides caractérisées par la présence simultanée de bacilles fusiformes et de spirochètes, on rencontre les formes en fuseau dans les couches les plus externes, plus ou moins en contact avec l'air atmosphérique et avec une infinité d'autres bactéries pullulant en surface, tandis que les formes spirillaires sont surtout visibles dans les couches profondes, à proximité des tissus normaux, où on les rencontre presque en culture pure.

10° Une propriété caractéristique et constante des cultures spirochétiennes, aussi bien que des cultures fusiformes, consiste dans la production d'une grande quantité de corps sphéroïdes. Ces corps apparaissent tout d'abord sous la forme de petites granulations qui se colorent facilement. Ensuite, ils augmentent de volume et constituent la quasi-totalité de la masse microbienne qui, alors, ressemble à une zooglé. En même temps diminue l'affinité de ces granulations vis-à-vis des liquides colorants.

On n'a pas pu encore élucider le rôle biologique de ces corps sphéroïdaux.

11° Cultures fusiformes et cultures spirochétiennes se comportent chez les animaux de laboratoire de façon identique. Dans l'organisme la multiplication de ces microbes est exceptionnelle ou même fait défaut. Il semble que leur rôle pathogène se manifeste seulement par une simple action toxique déterminée par leurs protéides. Cependant, le passage des bacilles fusiformes à travers l'organisme animal semble faciliter le recouvrement de la propriété, antérieurement perdue de se recroqueviller autour de l'axe médian. En effet, dans les repiquages du sang et des organes de l'animal mort à la suite d'abondantes injections péritonéales ou intraveineuses de b. fusiformes, réapparaissent souvent des figures spiralées typiques.

Les Héliconèmes vivants ne sont pas des microbes gazogènes

et leurs cultures, en milieux solides ou liquides, ne dégagent aucune odeur. Ils sont très fragiles, très délicats et exigent des conditions d'anaérobiose seulement partielle. En effet, les repiquages profonds dans les tubes de gélose, même additionnée de glucose, de liquide ascitique, de sérum, etc., restent toujours stériles. Si, au-dessus de la géloseensemencée, on verse une couche épaisse de gélose liquide, les Héliconèmes grimpent à travers l'épaisseur de cette couche et s'arrêtent à 1 millimètre de la surface externe. Là ils forment une riche agglomération zonale de colonies, bien visibles même à l'œil nu.

13° De l'ensemble des recherches expérimentales effectuées sur le rôle biologique et sur le pouvoir pathogène des héliconèmes, on ne peut tirer des conclusions définitives en ce qui concerne la réelle importance étiologique de ces microbes dans les processus pathologiques nombreux et variés, où ils se montrent parfois en quantités énormes.

14° Un examen attentif des descriptions morphologiques et des caractères biologiques relatifs aux nombreux bacilles fusiformes, aérobies et anaérobies, que beaucoup d'auteurs affirment avoir isolés en cultures plus ou moins pures, entraîne la conviction que ces microbes ne peuvent nullement être identifiés avec le *b. fusiforme* d'origine spirochétienne.

15° Après ce que nous avons dit, on ne peut désormais douter que dans les associations dites fuso-spirochétiennes ou fuso-spirillaires, les formes en fuseau et spiralées tirent leur origine d'une souche commune de microbes, que nous avons dénommés *Heliconema Vincenti*.

EXPLICATION DES PLANCHES

Planche I.

FIG. 1 et 2. — Culture spirochétienne de onze jours, en gélatine.

FIG. 3. — La même culture, de quatorze jours; formes nettement spirillaires, analogues à celles de la figure 4.

FIG. 4. — Microphotographie d'un frottis d'angine de Vincent.

FIG. 5. — Microphotographie d'un frottis gingival, où l'on peut observer trois spirochètes buccaux.

FIG. 6 et 7. — Culture spirochétienne de quatorze jours, en gélatine contenant du sang de cobaye.

FIG. 8 et 9. — Culture de spirochètes sur gélose-rein, de six jours.

- FIG. 10. — Culture symbiotique, en bouillon, de spirochètes et de *B. mesentericus vulgatus*, au bout de six jours.
FIG. 11. — La même culture au bout de quinze jours.
FIG. 12. — Spirochètes cultivés dans une vieille culture filtrée de *B. mesentericus vulgatus* (trois jours).

Planche II.

- FIG. 13 et 14. — Spirochètes de la culture précédente au bout de six jours ; formations nettement fusiformes.
FIG. 15 et 16. — Bacille fusiforme cultivé sur gélose-rate (cinq jours).
FIG. 17 et 18. — Bacille fusiforme cultivé sur gélose-rein (quarante-huit heures).
FIG. 19. — La même culture au bout de cinq jours.
FIG. 20. — La même culture au bout de six jours.
FIG. 21. — La même culture au bout de huit jours.
FIG. 22. — La même culture au bout de dix jours.
FIG. 23. — Bacille fusiforme cultivé sur gélose-sérum (huit jours).
FIG. 24. — Bacille fusiforme cultivé sur gélose glucosée (neuf jours).

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES SUR LES PIROPLASMOSES BOVINES D'ALGÉRIE

(DEUXIÈME MÉMOIRE [1])

par EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT, F. LESTOQUARD
et EDM. PLANTUREUX

Dans un précédent mémoire (2), nous avons présenté les résultats de nos premières recherches méthodiques sur les piroplasmoses bovines d'Algérie. La conclusion générale qui s'en dégageait, c'est que les piroplasmoses bovines algériennes sont au nombre de cinq : 1° la piroplasmose vraie, due à *Piroplasma bigeminum* (Smith et Kilborne); 2° une babésiellrose, due à *Babesiella berbera* n. sp.; 3° l'anaplasmose, due à *Anaplasma marginale* (Theiler); 4° une theilériose, due à *Theileria dispar* n. sp.; 5° la gondériose, due à *Gonderia mutans* (Theiler), cette dernière non pathogène. La piroplasmose, la babésiellrose et l'anaplasmose commencent par un accès aigu de première invasion, suivi d'un stade d'infection chronique de longue durée pendant lequel les animaux infectés possèdent l'immunité relative ou *prémunition*. La theilériose est caractérisée uniquement par un accès aigu et confère l'immunité vraie, stérilisante. La gondériose, apyrétique et généralement chronique d'emblée, ne comporte ni immunité, ni prémunition.

Depuis lors, nous avons poursuivi sans arrêt nos observations et expériences sur le même sujet, en les orientant surtout vers la recherche d'une méthode de vaccination contre les piroplasmoses.

A cette occasion, nous avons relevé un certain nombre de faits

(1) Le détail des observations et expériences sera publié dans les *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 5, 1927.

(2) Voir ces *Annales*, 38, n° 4, avril 1924, p. 273-343.

qui confirment, complètent et parfois corrigent nos conclusions antérieures. Ce deuxième mémoire exposera donc à la fois les connaissances théoriques nouvelles que nous avons acquises chemin faisant, pour ainsi dire, et les résultats d'ordre pratique auxquels nous sommes parvenus. On verra, à la lecture, que si la question de la vaccination antipiroplasmique a nécessité de longues investigations et un matériel bovin très important par le nombre, on peut la considérer d'ores et déjà comme résolue, en ce qui concerne les piroplasmoses de notre pays. Les procédés de prémunition prophylactique que nous recommandons restent évidemment perfectibles; mais, tels que nous allons les décrire, ils n'en sont pas moins susceptibles d'une application courante. Au surplus, ils ont déjà subi aux champs, à plusieurs reprises, l'épreuve d'une expérimentation assez vaste pour nous autoriser à les signaler à l'attention des éleveurs et des vétérinaires praticiens.

Parcilles recherches, si coûteuses dans le moment présent, n'auraient pu être conduites avec l'ampleur nécessaire sans le concours que le Gouvernement général de l'Algérie et, en particulier, la Direction de l'Agriculture, nous a généreusement accordé depuis 1924. Que MM. les gouverneurs généraux Steeg et Viollette et M. Brunel, directeur de l'Agriculture, veuillent bien trouver ici l'hommage de notre gratitude pour le haut intérêt qu'ils n'ont cessé d'accorder à nos travaux. Nous remercions aussi M. Emile Fages, propriétaire à Sétif, MM. les vétérinaires Canac et Grossetti de leur dévoué concours.

Ce deuxième mémoire, comme le précédent, exposera successivement, dans une première partie, les observations et expériences faites à propos de chaque piroplasmose : piroplasmose vraie, babésiellrose, anaplasmose, theilériose (1). Une seconde partie relatara les opérations de vaccination prémunitive auxquelles nous avons procédé en pleine campagne, c'est-à-dire dans les conditions mêmes de la pratique de tous les jours.

(1) Nous traiterons de la gondériose — infection sans maladie — à propos de la theilériose.

PREMIÈRE PARTIE

OBSERVATIONS ET EXPÉRIENCES

I. — PIROPLASMOSE VRAIE A *Piroplasma bigeminum*
(Smith et Kilborne, 1893).A. — *Isolement du virus.*

Nous avons réalisé à nouveau l'isolement de *P. bigeminum* par la méthode des *passages successifs rapides in vivo*. Cette méthode permet d'obtenir le virus à l'état pur. En partant d'un veau porteur de *P. bigeminum* (infection chronique), de *Theileria dispar* (accès aigu) et d'*Anaplasma marginale* (infection chronique), nous sommes arrivés, après 5 passages de bovin à bovin, opérés en vingt et un jours, à séparer *P. bigeminum* des parasites auxquels il était primitivement associé.

A l'occasion de cet isolement et aussi dans une autre circonstance où la transmission du virus en série fut, de même, rapidement réalisée (5 passages en trente-deux jours), nous avons constaté, derechef l'exaltation progressive de la virulence de *P. bigeminum*, inoculé dans la veine. L'inoculation sous-cutanée l'atténue, au contraire.

B. — *Traitement.*

Le *trypanobléu*, de Maurice Nicolle et F. Mesnil, reste le médicament par excellence de la piroplasmose vraie. Son emploi ne va pas, cependant, sans quelques inconvénients. Ainsi que d'autres auteurs, A. Theiler en particulier, l'ont noté avant nous, l'injection intraveineuse de trypanobléu, à la dose classique de 1 gramme par 100 kilogrammes d'animal, provoque chez les bovins en accès aigu de piroplasmose une élévation passagère de la température qui varie de 0°5 à 1°8, et des symptômes parfois alarmants : tremblements musculaires localisés ou généralisés et surtout accélération des mouvements respiratoires allant dans certains cas jusqu'à la dyspnée et même

l'asphyxie, et qui sont l'expression clinique d'un œdème aigu du poumon, susceptible d'entraîner la mort du sujet. Hyperthermie et troubles cliniques marchent de pair avec la disparition des parasites du sang ; ils sont la conséquence directe de la libération soudaine des produits toxiques contenus dans les piroplasmes détruits par le trypanobléu. On comprend alors que les accidents observés soient d'autant plus violents que le taux du parasitisme est plus élevé et que la dose de médicament est plus forte. Nous avons d'ailleurs vérifié que le trypanobléu, injecté à des animaux indemnes de piroplasmose vraie ou même à des animaux en état d'infection chronique, ne produit rien de semblable.

Pour éviter ce choc brutal, nous avons cherché la dose minima de médicament suffisante pour « couper » l'accès aigu de piroplasmose, c'est-à-dire pour mettre un terme aux phénomènes infectieux qui peuvent compromettre la vie des malades. En présence, en effet, d'un accès de première invasion, caractérisé par la pullulation massive des piroplasmes et par des troubles cliniques graves, il ne convient pas tant de rechercher la suppression totale des parasites que de permettre à l'organisme de reprendre son équilibre. La *therapia sterilisans magna* n'est d'ailleurs pas réalisable, ni même souhaitable en l'occurrence : la destruction complète des hématozoaires priverait le sujet de la prémunition à l'égard de *P. bigeminum*, laquelle ne peut exister qu'à la faveur de la persistance des parasites dans l'économie. En d'autres termes, il ne faut demander au trypanobléu que de guérir les symptômes aigus et de réduire le parasitisme sanguin à un taux tolérable par l'organisme.

Ce résultat peut être obtenu avec des doses de médicament bien inférieures à la dose classique. Chez des bovins de 200 à 300 kilogrammes, en accès aigu de piroplasmose vraie, des quantités de trypanobléu égales à 20 et 10 centigrammes suffisent à amener la chute définitive de la température en moins de vingt-quatre heures. La poussée thermique et l'accélération des mouvements respiratoires s'observent encore après l'injection, mais à un moindre degré, et ne présentent jamais un caractère alarmant.

L'emploi de faibles doses offre un autre avantage. On sait que le trypanobléu colore fortement les tissus et que cette colo-

ration, persistante, rend pendant longtemps la viande des animaux impropre à la consommation. Or, après l'injection intraveineuse de 0 gr. 10 à 0 gr. 20, la couleur de la viande est très peu modifiée et n'entraîne plus la saisie à l'abattoir quand on abat l'animal dans les semaines qui suivent l'intervention.

Enfin, par cette technique, on réalise une économie sensible de médicament et l'on peut pratiquer l'injection à la seringue (0 gr. 20 de trypanobleu pour 20 cent. cubes d'eau physiologique), sans recourir à un injecteur, toujours encombrant.

On aurait pu craindre que l'emploi des faibles doses favorisât la formation de souches de *P. bigeminum* résistantes au trypanobleu. Nous nous sommes assurés, par une expérience, qu'il n'en était rien. Nous considérons donc qu'à tous égards la quantité de trypanobleu la plus convenable pour le traitement des accès aigus de piroplasmose vraie est de 10 à 20 centimètres suivant la taille de l'animal.

C. — *Prémunition.*

Après bien des observateurs, nous avons constaté qu'une première atteinte de piroplasmose vraie est suivie d'une période d'infection chronique latente, pendant laquelle les animaux porteurs de germes résistent remarquablement aux réinoculations : ils ont acquis cette forme de l'immunité qu'on a appelée immunité relative ou immunité-tolérance et que, pour la clarté et la commodité du langage, nous nommons prémunition. Nous avons voulu préciser, en ce qui concerne le *P. bigeminum* algérien, les caractères généraux de cette prémunition, et, en particulier, sa fréquence, sa durée et sa valeur protectrice.

1° FRÉQUENCE DE LA PRÉMUNITION. — La prémunition, c'est-à-dire la résistance d'un animal en état d'infection chronique à la surinfection, s'est montrée constante chez tous nos bovins d'expérience. Les animaux prémunis, soumis à la réinoculation expérimentale de *P. bigeminum*, n'accusent le plus souvent aucune réaction appréciable par la suite. Certains réagissent par un accès parasitaire léger, accompagné ou non d'un accès thermique de très courte durée. Nous n'avons jamais observé

d'accès de réinoculation mortel, quelles que fussent la quantité et la virulence du virus inoculé à l'épreuve.

2° DURÉE DE LA PRÉMUNITION. — La prémunion corrélative de l'infection chronique dure autant que celle-ci. C'est ainsi que nous l'avons vu persister durant vingt-deux mois au moins chez un bovin, et quinze mois au moins chez deux autres. Un quatrième, infecté de *P. bigeminum* depuis quatorze mois, a présenté, à la suite de la réinoculation du même virus, un accès thermique éphémère et un accès parasitaire de six jours (maximum : 45 parasites pour 1.000 globules rouges). La prémunion de cet animal commençait donc à faiblir au moment de l'épreuve.

3° VALEUR PROTECTRICE DE LA PRÉMUNITION. — Pour apprécier le degré de résistance conféré par la prémunion, nous avons soumis à une réinoculation sévère de *P. bigeminum* (injection intraveineuse de 10 cent. cubes de sang citraté provenant d'un veau en accès aigu de piroplasmose vraie et contenant 40 parasites pour 1.000 globules rouges) sept bovins prémunis depuis cinq et six mois. Deux témoins neufs reçurent la même dose de virus, par la même voie. Parmi les bovins prémunis, un seul présenta un accès thermique d'un jour de durée et d'origine d'ailleurs douteuse; cinq autres n'accusèrent qu'un accès parasitaire parfaitement supporté; le septième ne réagit en aucune manière. Les deux veaux témoins, au contraire, contractèrent une infection normale (accès aigu, thermique et parasitaire).

4° PRÉMUNITION CROISÉE ENTRE DIFFÉRENTES SOUCHES ALGÉRIENNES DE *P. BIGEMINUM*. — Dans notre précédent mémoire, nous avons montré par l'épreuve des réinoculations croisées l'identité spécifique de deux souches algériennes de *P. bigeminum*. En raison de l'importance de la question du point de vue pratique, nous avons répété cette recherche et comparé entre elles, de la même façon, deux autres souches provenant de deux régions séparées par une distance de 300 kilomètres (souche *Gué*, des environs d'Alger, et souche *Sétif*, des Hauts-Plateaux sétifiens). Les résultats de l'expérience ont concordé en tous points avec ceux que nous avons déjà rapportés. Nous pouvons donc conclure

que des souches algériennes de *P. bigeminum* originaires de pays différents prémunissent les uns contre les autres.

D. — *Prémunition artificielle.*

La connaissance de la prémunition conférée par une première atteinte de piroplasmose à *P. bigeminum* a conduit depuis longtemps les expérimentateurs à essayer de provoquer artificiellement cette prémunition par des procédés offrant le moins de risques possible. Nous avons cherché, de notre côté,

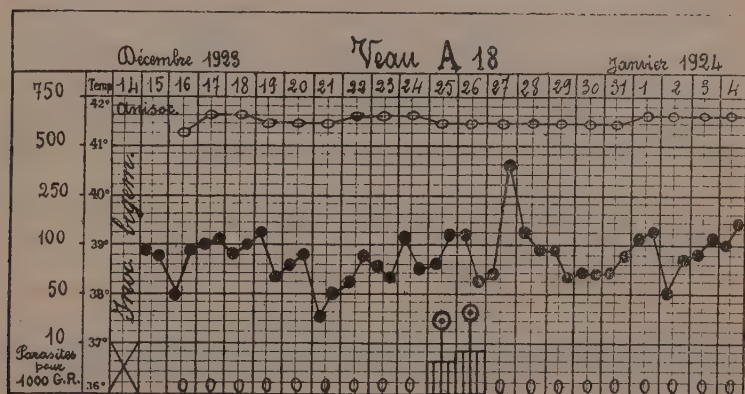


FIG. 1. — Piroplasmose vraie. Prémunition par virus d'infection chronique. Accès thermique et accès parasitaire.

une méthode de vaccination prémunitive qui permît d'infecter les animaux avec le minimum de danger, c'est-à-dire d'éviter les accidents aigus de l'accès de première invasion et de réaliser d'emblée l'infection chronique protectrice.

L'observation et l'expérimentation nous ont montré que les conséquences de l'inoculation de *P. bigeminum* à un bovin indemne diffèrent suivant le stade d'infection où se trouve le « donneur de virus ». Du sang prélevé au cours d'un accès aigu, thermique et parasitaire, donne régulièrement, aux animaux neufs à qui on l'inocule, un accès aigu, thermique et parasitaire, qui peut être grave, s'accompagner d'hémoglobiurie et d'ictère et se terminer par la mort. Au contraire,

l'inoculation de sang prélevé pendant le stade d'infection chronique provoque toujours une réaction faible. On peut observer soit un accès thermique durant vingt-quatre ou quarante-huit heures au plus, avec ou sans accès parasitaire, soit un accès parasitaire seulement; enfin, dans le tiers des cas au moins, on ne constate ni fièvre, ni accès parasitaire franc (prémunition silencieuse). En somme, les animaux neufs inoculés avec du virus d'infecté chronique se comportent à l'égard de cette primo-inoculation comme les animaux déjà prémunis à l'égard de la réinoculation de virus d'accès aigu. Ils entrent d'emblée ou presque dans la période d'infection chronique et acquièrent la prémunition sans aucun dommage.

Cette conclusion est tirée de près d'un millier d'observations. Sur 50 animaux pris au hasard, la proportion des différentes formes de réaction constatées à la suite de l'inoculation de « virus d'infection chronique » est la suivante :

Accès thermique et accès parasitaire.	10
Accès thermique seulement	40
Accès parasitaire seulement	42
Pas de réaction	18

Voici, d'autre part, quelques exemples de prémunitions ainsi obtenues.

1° EXEMPLE D'ACCÈS THERMIQUE ET PARASITAIRE. — Le veau A 51 est inoculé dans la veine avec 1 cent. cube de sang du veau A 15, en état d'infection chronique. Il réagit par un accès thermique et parasitaire léger :

	THERMIQUE	PARASITAIRE
Incubation	7 jours.	15 jours.
Durée de l'accès	2 jours.	3 jours.
Maximum.	40°2	1 P. b. p. 1:000 gl. r.

2° EXEMPLE D'ACCÈS THERMIQUE SANS ACCÈS PARASITAIRE APPARENT. — Le veau A 45 reçoit sous la peau 20 cent. cubes de sang du veau A 38 en état d'infection chronique. Après trois jours d'incubation, il présente un accès thermique (maximum : 40°) d'un jour de durée. Pas d'accès parasitaire.

Ce veau est éprouvé à deux reprises par la suite : une pre-

mière fois au bout d'un mois, par l'inoculation intraveineuse de 100 cent. cubes de sang du veau B 6, infecté chronique, et une deuxième fois, six mois plus tard, par l'inoculation intra-

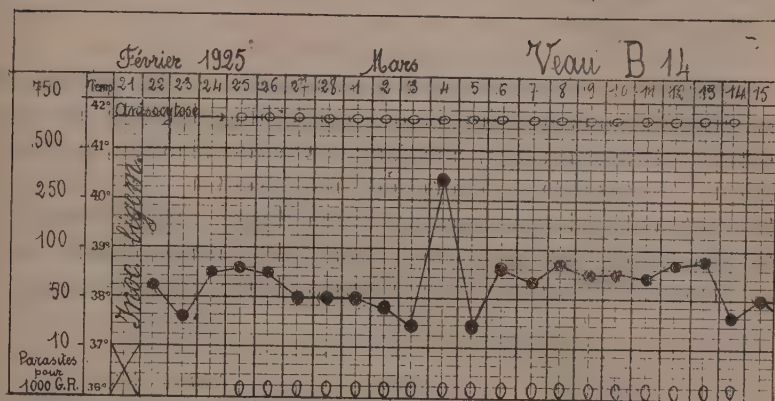


Fig. 2. — Piroplasmose vraie. Prémunition par virus d'infection chronique. Accès thermique sans accès parasitaire.

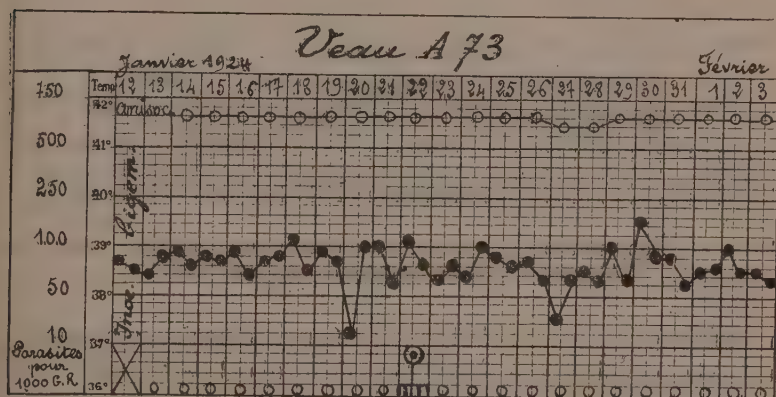


Fig. 3. — Piroplasmose vraie. Prémunition par virus d'infection chronique. Accès parasitaire sans accès thermique.

veineuse de 10 cent. cubes de sang du veau A 80. Aucune réaction après cette double épreuve. Le veau A 45 avait donc bien été prémuni par la première inoculation.

3° EXEMPLE D'ACCÈS PARASITAIRE SANS ACCÈS THERMIQUE. — La

génisse *B 10* reçoit sous la peau 1 cent. cube de sang du veau 22, en état d'infection chronique. Cette inoculation ne produit qu'un accès parasitaire : incubation : huit jours ; durée de l'accès : trois jours ; nombre maximum des parasites : 15 p. 1.000 globules rouges.

4° EXEMPLE DE « PRÉMUNITION SILENCIEUSE ». — Le veau *A 46* est inoculé sous la peau avec 1 cent. cube de sang du veau *A 38*, en état d'infection chronique. Aucune réaction, ni thermique, ni parasitaire (infection inapparente). Ce veau est éprouvé sept mois plus tard par l'inoculation intraveineuse de 50 cent. cubes de sang du veau *A 66* qui termine un accès aigu de piroplasmose vraie (6 parasites p. 1.000 globules rouges).

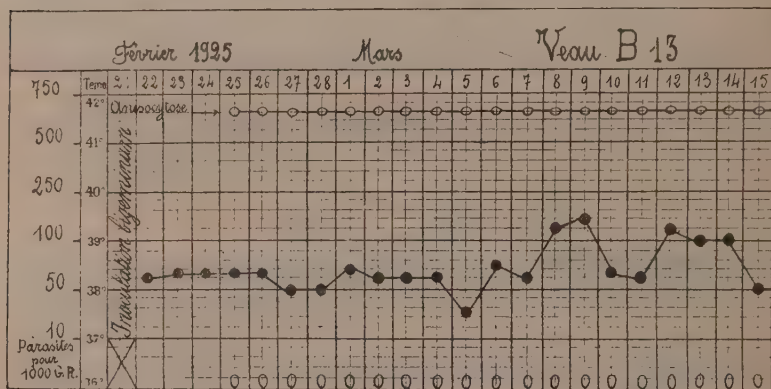


FIG. 4. — Piroplasmose vraie. Prémunition par virus d'infection chronique. Absence de réaction (infection inapparente).

Après onze jours d'incubation, le veau *A 46* accuse simplement un accès parasitaire de deux jours de durée (2 parasites p. 1.000 globules rouges, au maximum). La première inoculation l'avait réellement infecté et prémuni.

*
* *

Conditions pratiques de la prémunition.

Ainsi, on peut conférer la prémunition à des animaux neufs sans les exposer aux conséquences de l'accès aigu de première

invasion et sans recourir à d'autre artifice que de choisir comme vaccin un virus naturellement atténué ou raréfié par son séjour dans un organisme résistant. Cette notion étant acquise, nous avons voulu préciser quelles étaient les conditions les plus favorables à la pratique de la vaccination pré-munitive; nous avons considéré l'ancienneté et l'intensité de l'infection du « donneur de virus-vaccin », la voie d'inoculation, la quantité de sang à inoculer aux animaux neufs et le temps de survie du virus-vaccin dans le sang conservé *in vitro*.

1° ANCIENNETÉ DE L'INFECTION CHEZ LE DONNEUR. — Il est évident, *a priori*, que plus l'infection du donneur est récente et plus on court le risque de transmettre un accès aigu franc. Il convient, par suite, de connaître le moment à partir duquel un porteur chronique de germes peut servir à la prémunition artificielle sans danger pour les animaux vaccinés.

Les expériences auxquelles nous avons procédé à ce sujet ont permis d'établir que, dans les conditions les plus favorables à l'infection, c'est-à-dire en injectant le virus de chronique (sang infecté) dans la veine et en employant des fortes doses (de 10 à 200 cent. cubes) : 1° la réaction vaccinale est généralement trop vive si l'on prélève le virus-vaccin avant le troisième mois qui suit la fin de l'accès aigu du donneur; 2° au bout de huit mois, la réaction est satisfaisante; 3° aux environs du vingtième mois, le virus n'existe plus en quantité suffisante dans le sang circulant du donneur pour conférer à coup sûr la prémunition. L'histoire du veau A 29 infecté chronique de *P. bigeminum* (virus pur) et utilisé comme fournisseur de virus-vaccin à différents intervalles de temps est, à cet égard, démonstrative.

Le veau A 29 a présenté, en avril 1923, à la suite d'une inoculation expérimentale, un accès aigu normal de piroplasmose vraie, thermique et parasitaire.

Un mois après la fin de cet accès, 50 cent. cubes du sang de A 29 sont inoculés dans la veine du veau neuf B 1. Celui-ci réagit par un accès thermique de quatre jours de durée (maximum : 40°5) et un accès parasitaire de cinq jours (maximum : 90 p. 1.000 globules rouges).

Deux mois et demi après la fin de l'accès, 50 cent. cubes du sang du veau A 29 sont inoculés dans la veine du veau neuf A 6, qui réagit par un accès thermique (maximum : 41°6), coupé, le troisième jour, par une injection de trypanoblean.

Huit mois après la fin de son accès, le veau A 29 est saigné et le sang recueilli est inoculé en quantités variables (de 10 à 200 cent. cubes) dans la veine jugulaire de 10 animaux neufs (1) :

4 bovins reçoivent 200 cent. cubes;

1 bovin reçoit 100 cent. cubes.

3 bovins reçoivent 50 cent. cubes.

2 bovins reçoivent 10 cent. cubes.

Sept animaux réagissent par un accès thermique très court (durée : un jour; maximum thermique observé : 40°6) et par un accès parasitaire (maximum : 18 parasites p. 1.000 globules rouges). Les trois autres, ayant reçu respectivement 100, 50 et 10 cent. cubes de virus-vaccin, ne présentent qu'un accès parasitaire (maximum : 12½ parasites p. 1.000 globules rouges).

Neuf mois après la fin de son accès de première invasion, le veau A. 29 est saigné de nouveau : on inocule 10 cent. cubes de sang sous la peau des veaux neufs A 71 et A 73. Le veau A 71 ne réagit pas; il est cependant pré-muni, puisqu'il présente une rechute parasitaire légère de *P. bigeminum* un mois et demi plus tard, à la suite d'une inoculation de *Babesiella berbera*. Le veau A 73 fait seulement un accès parasitaire (durée : un jour; maximum des parasites : 2 p. 1.000 globules rouges):

Un an après la fin de son accès, le sang du veau A 29 est inoculé, à la dose de 5 cent. cubes, sous la peau des veaux neufs A 88 et C 10. Pas d'accès thermique, pas d'accès parasitaire.

Quatorze mois après la fin de son accès, 10 cent. cubes du sang du veau A 29 sont inoculés sous la peau des veaux neufs C 59 et C 60. L'un et l'autre font seulement un accès parasitaire d'un jour de durée (maximum des parasites : 2 p. 1.000 globules rouges).

Vingt et un mois après la fin de son accès aigu, le veau A 29 est saigné pour la dernière fois. On inocule 50 cent. cubes de sang dans la jugulaire du veau C 83. Pas de réaction. Ce veau C 83 n'est pas infecté, parlant pas pré-muni, car, réinoculé de *P. bigeminum*, dans la veine, un mois et huit jours plus tard, avec 50 cent. cubes de sang du veau C 89 qui a terminé un accès aigu de piroplasmose vraie, il se comporte comme un animal neuf et présente un accès aigu, thermique et parasitaire (2).

2° INFLUENCE DE L'INTENSITÉ DE L'ACCÈS AIGU DU DONNEUR SUR LA RÉACTION VACCINALE. — Lorsque l'accès de première invasion du donneur a été anormalement faible (comme il arrive, à la suite de l'inoculation de « virus de chronique »), l'intervalle de

(1) Un onzième bovin reçoit 500 cent. cubes dans le péritoine: accès parasitaire d'une durée de six jours (maximum : 38 parasites p. 1.000 globules rouges), sans accès thermique.

(2) Le veau A 29, dont le sang n'est plus infectant, à la dose de 50 cent. cubes, vingt et un mois après l'accès aigu, possède encore, cependant, la pré-munition, ainsi qu'une réinoculation d'épreuve l'a montré. La non-virulence du sang de cet animal, au moment considéré, peut s'expliquer par la rareté relative des parasites dans la circulation périphérique.

temps qui sépare la date de cet accès et la date de la prise de sang destiné à la vaccination prémunitive offre moins d'importance et peut être considérablement réduit. L'acuité de la réaction vaccinale dépend, en somme, de la quantité présumée de parasites que renferme le sang périphérique du donneur au moment de la saignée. Exemple :

Les veaux *L63* et *L66* ont présenté, à la suite d'une inoculation expérimentale de *P. bigeminum*, l'un un accès parasitaire sans fièvre (maximum des parasites : 5 p. 1.000 globules rouges), l'autre un accès thermique d'un jour de durée (maximum : 40°2) (avec un accès parasitaire de deux jours (maximum : 4 p. 1.000 globules rouges). On les saigne tous deux un mois et demi après la fin de l'accès parasitaire et on inocule le sang recueilli (conservé pendant quarante-huit heures à 18°), à la dose de 2 cent. cubes sous la peau de 5 veaux neufs et d'une vache laitière. Les 5 veaux ne montrent ni fièvre, ni parasites. La vache laitière fait seulement un accès parasitaire (durée : six jours ; maximum des parasites : 35 p. 1.000 globules rouges).

La raréfaction du virus peut d'ailleurs être obtenue artificiellement en traitant l'accès aigu du donneur par le trypanoblu. Ce médicament, en hâtant le passage de l'infection au stade chronique, permettrait d'avoir à volonté des fournisseurs de virus-vaccins convenables, dans le cas où on ne disposerait pas de vieux porteurs de germes. Exemple :

Le veau *L58*, inoculé dans la veine avec 2 cent. cubes de sang du veau *L50* en accès aigu fait, après cinq jours d'incubation, un accès aigu, thermique et parasitaire, de piroplasmose vraie. Le deuxième jour de l'accès parasitaire (200 *P. bigeminum* pour 1.000 globules rouges), on injecte 0 gr. 40 de trypanoblu. Le lendemain, le taux des parasites tombe à 1 p. 1.000.

Dix-sept jours après, le veau *L58* est saigné et on inocule 20 cent. cubes de son sang sous la peau des veaux *L56* et *L57*. Les deux animaux sont prémunis d'emblée, sans accès thermique.

3° VOIE D'INTRODUCTION DU VIRUS-VACCIN. — Comme on a pu le voir par les observations précédentes, la prémunition d'emblée est réalisable par toutes les voies : intrapéritonéale, intraveineuse, sous-cutanée. L'inoculation intrapéritonéale doit être écartée, dans la pratique, comme incommode ; elle expose en outre à des complications septiques. L'inoculation intraveineuse, facile au laboratoire, l'est beaucoup moins dans les conditions habituelles de la vaccination à la campagne. D'autre part, par cette voie, la virulence de *P. bigeminum* s'exalte facilement et l'on peut craindre, pour certains animaux parti-

culièrement sensibles, une réaction trop violente. C'est donc, en définitive, à l'inoculation sous-cutanée qu'il convient de donner la préférence.

4° DOSES DE VIRUS-VACCIN A EMPLOYER. — Deux séries d'expériences nous ont servi à fixer la dose de virus-vaccin à employer dans la pratique de la prémunition.

A. — Un bovin algérien (veau 22), contaminé de *P. bigeminum* dans la nature depuis dix-huit mois au moins, est « rechargé » de virus et présente, à la suite de cette réinoculation, une légère rechute parasitaire (22 parasites pour 1.000 globules rouges). Trois mois après, il est saigné (pas de parasites visibles dans le sang) et on inocule 5 animaux neufs, sous la peau, avec des doses différentes du sang recueilli :

1/10 de cent. cube à 2 bovins.

1/5 de cent. cube à 1 bovin.

1 cent. cube à 1 bovin.

10 cent. cubes à 1 bovin.

Avec 1/10 de centimètre, la prémunition a été donnée [une fois sur deux ; avec 1/5 de cent. cube, 1 cent. cube et 10 cent. cubes, elle a été obtenue dans tous les cas, sans accès thermique, ainsi que l'ont prouvé les réinoculations d'épreuve auxquelles les mêmes animaux ont été soumis plus tard.

B. — Le veau A 29, donneur de virus, est saigné au treizième mois de son infection chronique. L'inoculation sous-cutanée de 5 cent. cubes du sang de ce veau à 17 animaux neufs et de 10 cent. cubes à 8 autres les prémunit tous normalement, sans accès thermique.

La dose de virus-vaccin (sang d'infecté chronique) à employer par la voie sous-cutanée, pour une prémunition certaine et sans danger, est donc comprise entre 1 et 10 cent. cubes.

5° SURVIE DU VIRUS-VACCIN DANS LE SANG CONSERVÉ. — Nous avons vérifié à mainte reprise que le *P. bigeminum* algérien, comme les parasites de même espèce des autres pays, reste vivant et virulent dans le sang conservé *in vitro*. Cette survie est de durée suffisamment longue pour permettre le transport du virus-vaccin à distance et la pratique de la vaccination pré-munitive loin du laboratoire.

*
* *

En résumé, les recherches que nous venons d'exposer confirment l'existence de la prémunition protectrice dans la piro-

plasmose vraie à *P. bigeminum*, montrent la possibilité de la conférer sans risques et précisent les conditions dans lesquelles cette prémunition est réalisable en milieu algérien : choix du donneur de virus-vaccin, mode d'inoculation et dose à adopter.

II. — BABÉSIELLOSE

à *Babesiella berbera*, Edm. Sergent, A. Donatien, L. Parrot, F. Lestoquard, E. Plantureux et H. Rougebief, 1924 (1).

A. — Identité générique et spécifique.

La définition et même la validité du sous-genre *Babesiella* Mesnil ayant été remises en question par des travaux récents, nous devons déclarer que les recherches poursuivies depuis trois ans, à Alger, confirment la valeur des caractères utilisés par différents auteurs et par nous-mêmes pour séparer les *Babesiella* des *Piroplasma sensu stricto* et basés sur la morphologie, sur l'épreuve des réinoculations croisées et sur l'action curative du trypanobleu.

En particulier, les deux babésielloses bovines à *B. berbera* et à *B. major* (2) que nous avons étudiées, ainsi que la babésiellose ovine (3), sont, de la façon la plus nette, réfractaires au médicament. Dans la babésiellose bovine nord-africaine, l'injection intraveineuse de trypanobleu, à la dose de 1 gramme par 100 kilogrammes d'animal, ne modifie ni le nombre des parasites, ni la courbe thermique, ni les symptômes de l'accès de première invasion. Il en va de même dans la babésiellose ovine nord-africaine. En ce qui concerne la babésiellose à *Babesiella major*, des bovins français, le trypanobleu n'exerce aucune influence sur l'évolution de l'accès parasitaire.

Nous maintenons donc que l'efficacité du trypanobleu dans les piroplasmoses vraies, bovine, ovine et équine, et son inef-

(1) On verra, plus loin, au chapitre III (*Anaplasmose*) les courbes des veaux A₁, A₂, A₃, A₄ (fig. 9, 10, 11, 12), qui montrent un exemple d'isolement à l'état de pureté du virus *Babesiella*, qui était mêlé à du virus *Anaplasma*, grâce à la méthode des passages successifs rapides *in vivo*.

(2) ED. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT, F. LESTOQUARD, E. PLANTUREUX, Des piroplasmoses bovines du sous-genre *Babesiella*. Description d'une nouvelle espèce *B. major* (origine : France). Ces Annales, 40, juillet 1926, p. 582-594. Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 4, juin 1926, p. 318-339.

(3) F. LESTOQUARD, Les piroplasmoses du mouton en Algérie. Bull. Soc. Path. exot., 17, 13 février 1924, p. 122-125. Ibidem, 18, 11 février 1925, p. 144-145. Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 4, juin 1926, p. 222-317.

ficacité complète dans les babésielloses fournissent un caractère distinctif de grande valeur théorique et pratique entre ces deux groupes de maladies.

Dans notre premier mémoire, nous avons différencié *B. berbera* des autres *Babesiella* bovines alors connues. Nous avons pu la comparer depuis à une nouvelle *Babesiella* européenne, *B. major* (1). Celle-ci se distingue de tous les représentants du sous-genre, et de *B. berbera* particulièrement, par sa taille plus grande, par l'angle des éléments bigeminés, généralement aigu, par sa situation toujours centrale dans le globule rouge et enfin par l'épreuve des réinoculations croisées.

B. — *Traitement.*

On ne connaît pas encore de médicament spécifique de *B. berbera*, comparable au trypanoblu. Le glucose en injection sous-cutanée et intraveineuse ayant été signalé récemment comme doué de propriétés curatives à l'égard de la babésiellose nord-africaine, nous l'avons employé dans un cas, à la dose de 60 grammes (300 cent. cubes d'une solution à 20 p. 100). Il n'a eu aucune action favorable sur l'évolution de l'accès aigu.

C. — *Prémunition.*

1^o FRÉQUENCE, DURÉE ET VALEUR PROTECTRICE. — Comme nous l'avons déjà montré, une première atteinte de babésiellose laisse après elle une infection chronique qui ne se traduit par aucun symptôme morbide et qui procure aux animaux le bénéfice de la prémunition. Cette prémunition offre les mêmes caractères généraux que la prémunition que l'on observe dans la piroplasmose vraie :

1^o Elle est constante.

2^o Les animaux prémunis, réinoculés de *B. berbera*, réagissent soit par un accès parasitaire seulement, soit par un accès parasitaire accompagné d'un court accès thermique; le plus souvent, on ne constate aucune réaction. L'épreuve de réinoculation ne cause jamais d'accidents mortels.

(1) *Loc. cit.*

3° La prémunition corrélative de l'infection chronique dure autant que celle-ci. Nous l'avons vue persister jusqu'à dix-huit, dix-neuf, vingt et un et vingt-deux mois au moins.

4° Des animaux en état d'infection chronique depuis un à neuf mois résistent parfaitement à une réinoculation sévère (injection intraveineuse de virus prélevé pendant l'accès aigu). La prémunition acquise à la suite d'une première atteinte de babésiellose protège donc très efficacement les animaux contre les réinfections.

2° PRÉMUNITION CROISÉE ENTRE DIFFÉRENTES SOUCHES ALGÉRIENNES DE *B. berbera*. — La souche *Kaddous*, que nous conservons pure au laboratoire depuis quatre ans, par passages successifs sur des bovins importés de France, a toujours été bénigne et n'a jamais causé la mort de nos animaux d'expériences. Dans la nature, il existe, au contraire, des souches très virulentes. On observe en effet chaque année, en Algérie, des accès mortels de babésiellose, diagnostiqués par l'examen microscopique. En août 1926, nous avons pu nous procurer un de ces virus en inoculant le sang d'un taureau, guéri depuis quatre jours d'un accès aigu de babésiellose naturelle, à un veau français neuf. Cette nouvelle souche, dite souche *Marengo*, était et est restée très virulente, car, au troisième passage, elle a tué les deux veaux de race française inoculés. Nous avons voulu voir si la souche bénigne *Kaddous* prémunissait contre la souche maligne *Marengo*. Les expériences de réinoculations croisées auxquelles nous avons procédé à cet effet ont répondu par l'affirmative. Il y a identité spécifique entre les deux virus.

D. — *Prémunition artificielle.*

Nous avons appliqué à la prémunition artificielle contre *Babesiella berbera* les mêmes principes qu'à la prémunition contre *Piroplasma bigeminum*.

Comme dans le cas de *P. bigeminum*, l'inoculation de *B. berbera* (sang infecté) à des animaux neufs produit des réactions différentes suivant le stade d'infection auquel se trouve le fournisseur de virus : accès aigu grave, si le virus est prélevé au cours de l'accès aigu de première invasion ; infection chro-

nique d'emblée, souvent inapparente, ou accès bénin de première invasion, si le virus est prélevé pendant la période d'infection chronique. Sur 90 animaux pris au hasard, la pro-

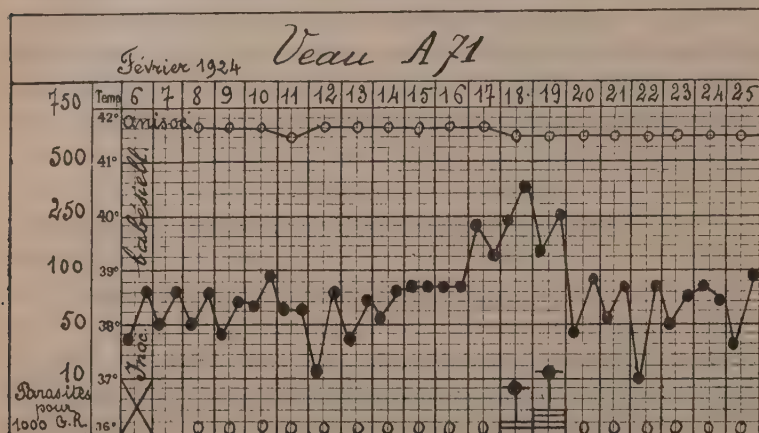


FIG. 5. — Babésiellose. Prémunition par virus d'infection chronique. Accès thermique et accès parasitaire.

portion des différentes formes de réaction observées à la suite de l'inoculation de « virus de chronique » a été la suivante :

Accès thermique et accès parasitaire.	48
Accès thermique seulement.	16
Accès parasitaire seulement	10
Pas de réaction appréciable	49

En voici quelques exemples :

1° *Accès thermique et accès parasitaire.* — Le veau A 16 est inoculé sous la peau avec 10 cent. cubes de sang du veau A 26, infecté chronique de babésiellose depuis dix mois :

	THERMIQUE	PARASITAIRE
Incubation	11 jours.	12 jours.
Durée de l'accès	2 jours.	2 jours.
Maximum	40°5	4 p. 1.000 gl. r.

2° *Accès thermique seulement.* — Le veau A 63 reçoit sous la peau 10 cent. cubes de sang du veau A 26, infecté chronique depuis neuf mois :

Incubation thermique	18 jours.
Durée de l'accès.	2 jours.
Maximum	40°1

Pas de parasites visibles. Ce veau était bien infecté et prémuni, car, éprouvé un mois plus tard par l'inoculation intraveineuse de 10 cent. cubes de sang du veau 481 ayant terminé un accès de babésiose depuis deux mois, il

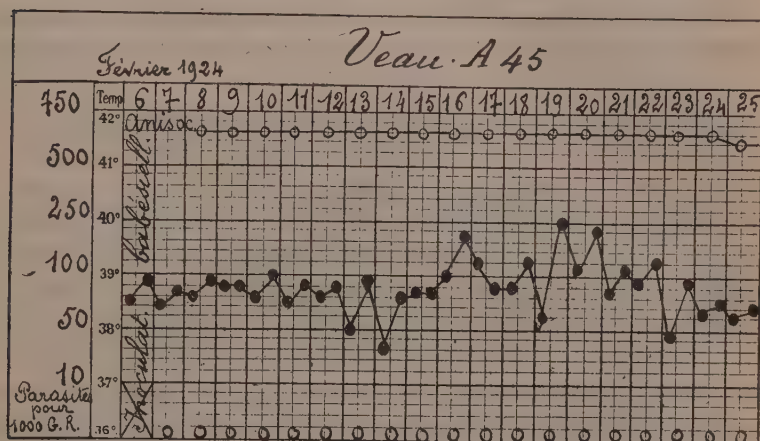


FIG. 6. — Babésiellose. Prémunition par virus d'infection chronique.
Accès thermique sans accès parasitaire.

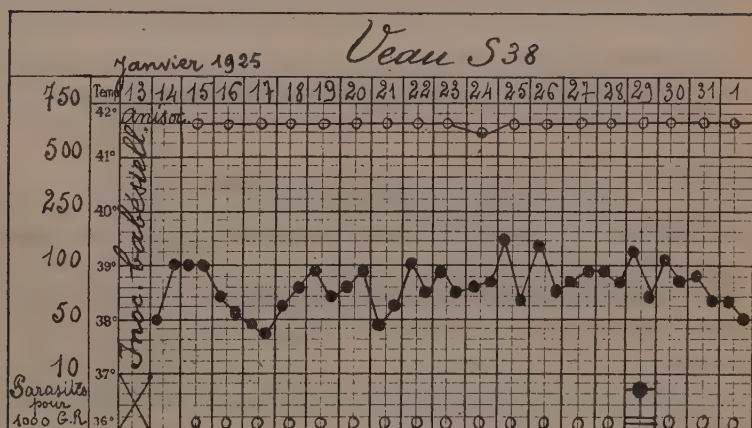


FIG. 7. — Babésiellose. Prémunition par virus d'infection chronique.
Accès parasitaire sans accès thermique.

n'accuse aucune réaction. Un veau neuf témoin, 482, fait au contraire un accès aigu normal.

3° Accès parasitaire seulement. — Le veau A 50 reçoit sous la peau 5 cent. cubes de sang du veau A 26, infecté chronique depuis treize mois. Pas de réaction thermique.

Incubation de l'accès parasitaire	8 jours.
Durée de l'accès parasitaire	1 jour.
Maximum de parasites	3 p. 1.000 gl. r.

4^e *Prémunition silencieuse.* — Le veau A39 reçoit sous la peau 10 cent. cubes de sang du veau A26, infecté chronique depuis neuf mois. Aucune réaction. Le veau A39 était cependant infecté et prémuni, car, éprouvé environ un

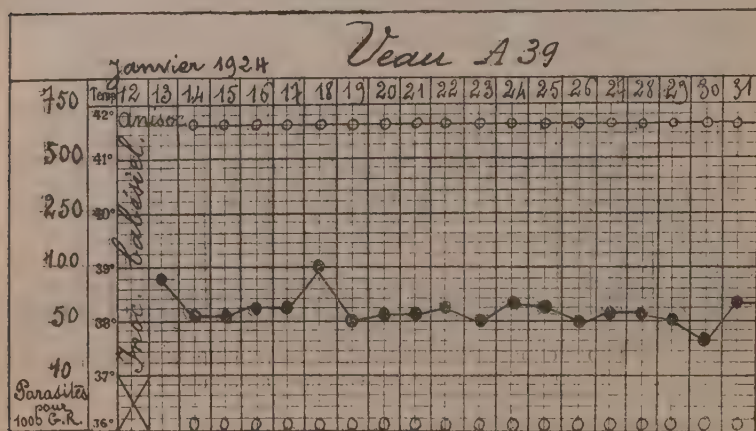


FIG. 8. — Babésiellose. Prémunition par virus d'infection chronique. Absence de réaction (infection inapparente).

mois plus tard par l'inoculation intraveineuse de sang du veau A81, qui a terminé un accès de babésiellose depuis deux mois, il ne réagit pas davantage. Un veau neuf témoin, A82, présente au contraire un accès aigu normal.

Ces observations, prises entre plusieurs centaines d'autres, démontrent qu'il est possible de conférer sans dommages la prémunition contre *B. berbera*, à la condition de choisir comme virus-vaccin du sang provenant d'un animal en état d'infection chronique.

*
* *

Conditions pratiques de la prémunition.

En ce qui concerne l'ancienneté de l'infection chez le donneur, plus cette infection est récente et plus l'on risque de transmettre aux animaux neufs une infection aiguë. En règle générale, c'est

à partir du troisième ou du quatrième mois que les porteurs de virus peuvent servir à la prémunition artificielle.

Comme *voie d'inoculation* du virus-vaccin, la voie sous-cutanée est la plus convenable. La *dose* de sang à injecter est comprise entre 2 et 10 cent. cubes. A ce sujet, il y a lieu d'observer une précaution portant sur la saignée du donneur. Par suite de la localisation bien connue des *Babesiella* dans les organes profonds, une saignée copieuse (telle qu'on la doit pratiquer lorsque l'on désire vacciner un grand nombre d'animaux à la fois) peut amener dans la circulation périphérique des parasites qui, normalement, restent cantonnés à l'intérieur des viscères. D'où une augmentation du parasitisme du sang recueilli, c'est-à-dire de la dose de virus inoculée. Pour éviter des surprises, il est donc indiqué de prélever de petites quantités de sang sur plusieurs donneurs plutôt qu'une grande sur un seul et de ne pas répéter les saignées à de brefs intervalles.

Enfin, nous avons vérifié à nouveau la conservation facile de *B. berbera in vitro*. La survie du parasite dans le sang citraté peut atteindre au moins dix jours à la température de 24°, délai bien supérieur aux nécessités de la pratique. Nous avons, mainte fois, transporté à plusieurs centaines de kilomètres et inoculé avec succès du virus-vaccin, après trois ou quatre jours de conservation.

**
* * *

En somme, la vaccination prémunitive contre la babésiellose à *B. berbera* comporte les mêmes techniques que la vaccination prémunitive contre la piroplasmose vraie.

III. — ANAPLASMOSE A *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910).

A. — *Isolement du virus.*

Le procédé d'isolement de *A. marginale* qui consiste à faire passer le virus par le mouton (Lignières), procédé dont nous confirmions la commodité dans notre premier mémoire, nous a donné toute satisfaction dans un nouvel-essai. En partant d'un bovin indigène, infecté chronique de *A. marginale*, de *P. bige-*

minum et de *G. mutans*, nous avons obtenu *A. marginale* à l'état pur après un seul passage.

Nous avons constaté aussi, chez des bovins algériens, l'existence d'infections naturelles à *A. marginale* qui étaient pures de tout mélange avec d'autres infections piroplasmiques.

B. — *Notes cliniques et expérimentales diverses.*

1° CAS D'ANAPLASMOSE A LONGUE INCUBATION. — L'inoculation à un bovin neuf d'une dose très faible de sang ($1/5$ de centimètre cube), prélevée sur un animal en état d'infection chronique depuis quatre mois et demi, a été suivie d'un accès d'anaplasmose après une incubation de durée anormale : quatre-vingts jours.

2° AVORTEMENT CHEZ LES VACHES, AU COURS DE L'ACCÈS AIGU D'ANAPLASMOSE. — Deux vaches laitières ont avorté, l'une quinze jours environ avant le terme, l'autre au huitième mois de la gestation au cours d'un accès aigu.

3° TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE DE L'ANAPLASMOSE. — Dans le premier de ces cas, le veau, né prématurément et mort trente minutes après sa naissance, présentait de très nombreux anaplasmes dans le sang du cœur.

4° HÉMOGLOBINURIE. — Une vache laitière, de race comtoise, a été atteinte d'ictère généralisé et d'hémoglobinurie pendant un accès aigu d'anaplasmose naturelle (maximum thermique : $40^{\circ}4$; maximum des parasites : 600 p. 1.000 globules rouges). L'animal a dû être abattu.

5° ACTION DE L'ANAPLASMOSE SUR LES AUTRES PIROPLASMOSES. — Chez les animaux en état d'infection chronique à *P. bigeminum*, à *B. berbera* ou à *G. mutans*, un accès d'anaplasmose provoque souvent une rechute *parasitaire* de l'une ou l'autre de ces piroplasmoses, sans symptômes morbides. La réapparition, en nombre variable, de *P. bigeminum*, de *B. berbera* ou de *G. mutans* dans le sang circulant a lieu surtout vers la fin de l'accès d'anaplasmose et surtout au printemps, comme

d'ailleurs les rechutes naturelles. C'est ainsi qu'en 1925, par exemple, l'anaplasme a causé 21 rechutes parasitaires à *G. mutans*, 7 à *P. bigeminum*, 2 à *B. berbera*, 1 à *B. major*. Toutes, à l'exception de 7 rechutes à *G. mutans*, ont été observées pendant les mois printaniers.

En règle générale, lorsque l'accès d'anaplasmose survient au cours d'un accès aigu d'une autre piroplasmose, les parasites correspondant à celle-ci disparaissent momentanément de la circulation périphérique. Ils n'y reparaissent qu'au moment où l'accès parasitaire d'anaplasmose se termine. Nous avons noté ce phénomène d'« occultation » dans 24 observations. Une fois seulement, un accès parasitaire de gondériose suivit son cours malgré l'accès concomitant d'anaplasmose.

Nous verrons d'autre part, au chapitre IV, qu'un accès aigu d'anaplasmose, survenant chez des animaux guéris d'une atteinte de theilériose, les prédispose aux récurrences de cette maladie.

C. — *Inoculation de l'anaplasme bovin à d'autres espèces animales.*

a) INOCULATION A L'ÂNE ET A LA CHÈVRE. — Des essais de transmission de *A. marginale* à l'âne (1 expérience) et à la chèvre (3 expériences) ont donné un résultat négatif. Ces animaux n'ont ni contracté la maladie, ni conservé le virus.

b) INOCULATION AU MOUTON. — Nous avons déjà exposé ailleurs (1) nos premières recherches sur la transmission de l'anaplasme algérien au mouton. Celles que nous avons effectuées depuis confirment nos conclusions. Sur 22 bovins inoculés soit dans la veine, soit dans le péritoine, soit sous la peau, avec du sang de mouton adulte (doses : de 1/10 de centimètre cube à 100 cent. cubes) ayant reçu de l'anaplasme du bœuf un mois ou deux mois auparavant, 2 seulement ont contracté l'anaplasmose. Un de ces animaux avait reçu 50 cent. cubes de sang dans la veine et l'autre 100 par la même voie. Le mouton peut donc conserver le virus de l'anaplasmose

(1) V. notre premier mémoire et *Bull. Soc. Path. exot.*, 18, 9 avril 1924, p. 295-298.

bovine, ainsi que l'a établi Lignières, mais cette conservation n'est pas constante.

D'autre part, les essais de transmission de mouton à mouton auxquels nous avons procédé sont restés infructueux.

**D. — Comparaison entre l'anaplasme argentin
et l'anaplasme algérien.**

On pouvait se demander, avec Lignières (1), si les différences que ses observations sur le même sujet présentent avec les nôtres provenaient d'une résistance particulière des moutons algériens au virus de l'anaplasmose ou bien si elles tenaient à la nature même du virus que nous avons étudié. Nous avons donc comparé l'anaplasme argentin, dont s'était servi Lignières, à l'anaplasme algérien. Nos expériences ont porté sur le mouton et sur le bœuf. Nous devons à l'obligeance de M. le Professeur Moussu d'avoir pu les réaliser.

M. le Professeur Moussu a bien voulu, en effet, nous envoyer deux échantillons de sang contenant de l'anaplasme argentin. L'un provenait d'une vache bretonne qui avait eu un accès aigu d'anaplasmose dix-huit mois auparavant et qui avait été réinoculée, avec le même virus, six mois plus tard — sans réagir — soit douze mois avant la saignée de prélèvement. Le sang défibriné, expédié de Paris, a été inoculé, après six jours de transport par la poste, à 2 bovins français neufs et à 1 mouton. Aucun de ces trois animaux ne s'est infecté.

L'autre échantillon provenait d'un bélier inoculé sept mois auparavant, dans la veine, avec du sang d'un mouton ayant reçu lui-même du sang de bovin atteint d'anaplasmose argentine. Le sang défibriné de ce bélier (virus de 2^e passage par le mouton) a été inoculé à Alger, après six jours de transport, dans la veine du mouton adulte n° 1. Deux mois après, le mouton n° 1 a été saigné à son tour et 10 cent. cubes du sang recueilli ont été inoculés, par la voie veineuse, au veau B11. Ce veau a présenté, après une période d'incubation qui dura un mois, un accès aigu, thermique et parasitaire, d'ana-

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, 17, 8 octobre 1924, p. 650.

plasmose (maximum thermique : 40°3; maximum des parasites : 170 p. 1.000 globules rouges).

Le virus du veau B11 nous a servi à appliquer à la comparaison de l'anaplasme argentin avec l'anaplasme algérien l'épreuve de la prémunition croisée : a) inoculation de virus argentin à 4 veaux prémunis contre le virus algérien et à 2 témoins neufs; b) inoculation de l'anaplasme algérien à 1 veau prémuni contre l'anaplasme argentin et à 1 témoin prémuni contre l'anaplasme algérien (1).

a) Dans la première série d'expériences, les veaux prémunis contre l'anaplasme algérien n'ont accusé aucune réaction à la suite de l'inoculation d'anaplasme argentin. Les veaux témoins neufs, au contraire, ont contracté normalement l'anaplasmoses.

b) Dans la seconde série d'expériences, le veau prémuni contre l'anaplasme argentin a présenté, à la suite de l'inoculation d'anaplasme algérien, un accès parasitaire léger (incubation quarante-sept jours, durée de l'accès : seize jours; pas d'anisocytose) sans fièvre, en tous points identique aux rechutes parasitaires que l'on observe, dans un tiers des cas environ (2), chez les bovins infectés chroniques d'anaplasme algérien que l'on réinocule avec ce même virus. Le veau témoin déjà prémuni contre l'anaplasme algérien n'a pas réagi.

On peut conclure de ces observations : l'anaplasme algérien prémunit contre l'anaplasme argentin, et réciproquement; *Anaplasma marginale* de souche algérienne est spécifiquement identique à *Anaplasma marginale* de souche argentine (= *A. argentinum* Lignières).

E. — *Traitement.*

Nous avons procédé à des essais de traitement de l'accès aigu d'anaplasmoses par divers médicaments, injectés dans la veine : bleu de méthylène (1 gramme par 100 kilogrammes d'animal, solution à 1 p. 100), novarsénobenzol (1 gramme par 100 kilogrammes), stovarsol (2 gr. 25 par 100 kilogrammes), bichlorhydrate de quinine (1 à 3 grammes), chlorhydrate d'émé-

(1) Du point de vue morphologique, l'anaplasme algérien et l'anaplasme argentin sont semblables.

(2) V. premier mémoire.

tine (0 gr. 30). Aucun de ces produits n'a exercé d'influence nette soit sur le nombre des parasites, soit sur l'évolution de la maladie. La décoction d'écorce de *racines de tamaris*, prise par ingestion, s'est montrée complètement inefficace.

F. — *Prémunition.*

La prémunition acquise par les animaux à la suite d'un accès de première invasion d'anaplasmose est *constante*. Les animaux en état d'infection chronique, que l'on réinocule, réagissent parfois par un *accès parasitaire* léger, toujours apyrétique et qui ne s'accompagne pas des lésions sanguines (anisocytose, poikilocytose, basophilie, etc.) caractéristiques de l'accès aigu primaire. Le plus souvent, on n'observe aucune réaction. Enfin, on ne constate jamais d'accident mortel pendant la rechute parasitaire de réinoculation, quelles que soient la virulence et la quantité du virus réinoculé.

La prémunition dure autant que l'infection chronique : nous l'avons vu persister jusqu'à vingt et un mois au moins. Elle permet aux animaux qui la possèdent de résister aux réinoculations les plus sévères (injection intraveineuse de sang provenant d'un bovin en accès aigu et très riche en parasites).

G. — *Prémunition artificielle.*

Lorsqu'on inocule un animal neuf avec le sang d'un bovin en accès aigu d'anaplasmose, on donne toujours un accès aigu. Si le sang provient d'un bovin porteur chronique de germes, l'infection transmise est tantôt chronique d'emblée, tantôt aiguë. Exemple d'accès aigu :

50 cent. cubes de sang du veau B67, qui a terminé un accès d'anaplasmose depuis onze mois, sont inoculés sous la peau du veau neuf L90. Celui-ci réagit par un accès aigu violent (durée de l'accès : quarante-trois jours; maximum thermique : 41°3; maximum des parasites : 746 p. 4.000 globules rouges).

Nous avons voulu nous assurer si, en partant d'un porteur chronique de germes, il était possible de donner à coup sûr et sans risques la prémunition, c'est-à-dire d'éviter régulièrement les accès graves, en diminuant la dose de virus inoculée. A cet effet, le sang d'un bovin, infecté chronique d'anaplasmose

depuis dix-huit mois, a été injecté sous la peau de 28 animaux, à des doses variant entre 1/10 de cent. cube et 10 cent. cubes. 7 sujets seulement se sont infectés : 1 avait reçu 1 cent. cube, 4 avaient reçu 5 cent. cubes et 2 avaient reçu 10 cent. cubes. Les animaux qui n'avaient pas réagi, éprouvés deux mois plus tard, ont tous contracté l'anaplasmose. Ils n'avaient donc pas été infectés ni prémunis par la première inoculation.

L'ensemble de ces faits montre qu'on ne saurait songer à se servir directement de « virus de chronique », dans la pratique, pour conférer la prémunition et que la méthode de vaccination prémunitive employée avec succès pour *P. bigeminum* et pour *B. berbera* n'est pas applicable à *A. marginale*. Nous avons donc été conduits à chercher d'autres procédés que nous allons décrire maintenant.

1^o PROCÉDÉ DU « VIRUS D'INCUBATION ». — A l'occasion de passages rapides effectués, de bovin à bovin, avec des virus tels que *B. berbera*, en vue de les purifier, nous avons fait la remarque suivante : lorsqu'on inocule à un animal neuf du sang infecté à la fois par *B. berbera* et par *Anaplasma marginale*, l'accès de babésiellose se développe après six jours en moyenne, l'accès d'anaplasmose après un mois seulement. Si l'on prélève du sang à ce deuxième animal au moment de l'accès de babésiellose et si on l'inocule à un troisième bovin, celui-ci reçoit des *B. berbera* d'accès aigu et du virus d'anaplasmose qui se trouve encore au stade d'incubation. Or, les anaplasmes prélevés ainsi *au cours de l'incubation* se montrent peu virulents, en raison sans doute de leur rareté dans la circulation périphérique du donneur à ce moment. L'accès d'anaplasmose qu'ils provoquent est d'autant plus bénin que la date du prélèvement est plus proche de la date de l'inoculation du donneur. Exemple :

Premier passage. — Le veau A1 reçoit dans la veine 10 cent. cubes du sang du veau 10 qui termine un accès aigu de babésiellose et qui est en état d'infection chronique par *A. marginale*. Le veau A1 fait d'abord un accès aigu de babésiellose (quatrième-onzième jours), puis un accès d'anaplasmose, thermique et parasitaire.

	THERMIQUE	PARASITAIRE
Incubation	30 jours.	23 jours.
Durée de l'accès	6 jours.	20 jours.
Maximum	41°5	450 p. 1.000 gl. r.

Anisocytose très marquée pendant 9 jours.

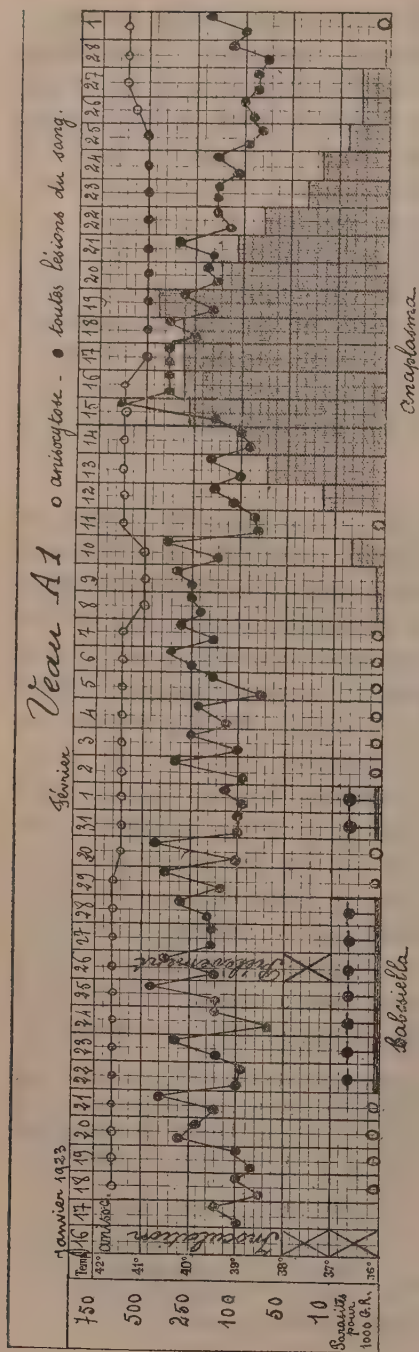


Fig. 9.

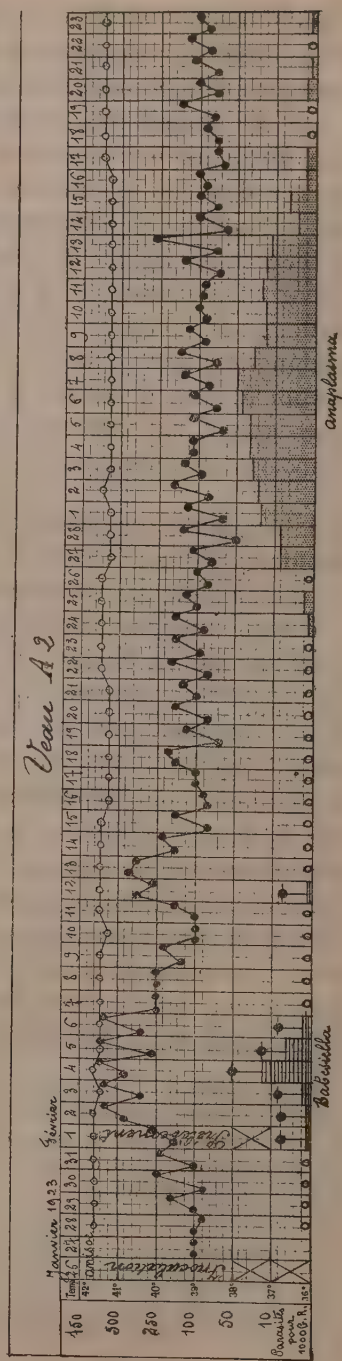


Fig. 10.

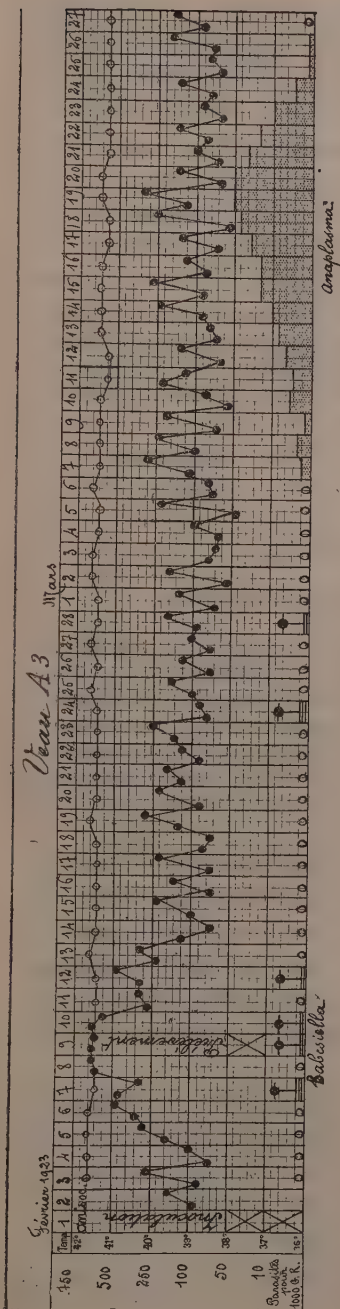


Fig. 11.

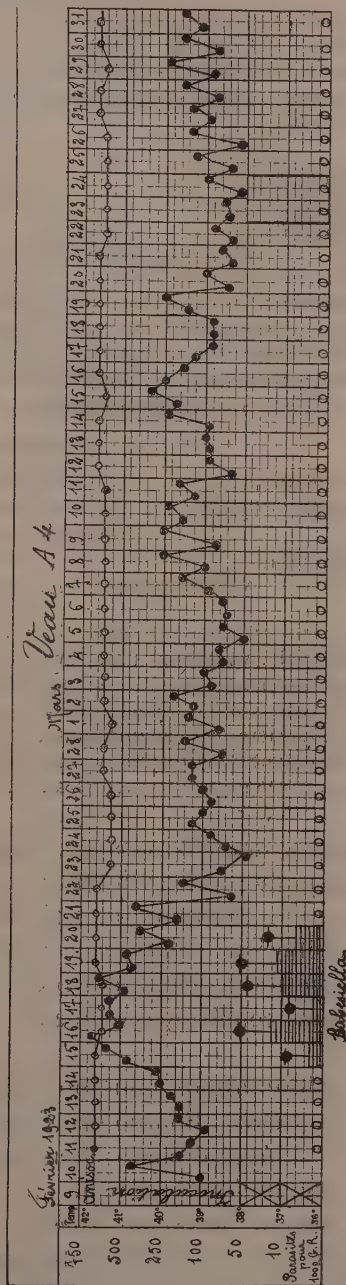


Fig. 12.

Fig. 9, 10, 11 et 12. — Passages successifs rapides de *Babesiella berbera* et de *A. marginale*. Atténuation des accès d'anaplasmose. Isolement de *Babesiella berbera* à l'état pur au quatrième passage.

Deuxième passage : Le veau A1 est saigné dix jours après son inoculation, c'est-à-dire treize jours avant l'apparition des anaplasmes dans la circulation périphérique. On inocule 10 cent. cubes du sang recueilli dans la veine du veau A2. Celui-ci réagit d'abord par un accès aigu de babésiellose (sixième-onzième jours), puis par un accès d'anaplasmosse plus bénin que l'accès du veau précédent :

	THERMIQUE	PARASITAIRE
Incubation	46 jours.	29 jours.
Durée de l'accès.	1 jour.	25 jours.
Maximum	40°1	50 p. 1.000 gl. r.

Anisocytose peu marquée pendant 17 jours.

Troisième passage. — Le veau A2 est saigné six jours après son inoculation, c'est-à-dire vingt-trois jours avant le début de l'accès parasitaire d'anaplasmosse. On inocule 10 cent. cubes du sang recueilli dans la veine du veau A3, qui fait successivement un accès aigu de babésiellose (cinquième-treizième jours) et un accès léger d'anaplasmosse :

	THERMIQUE	PARASITAIRE
Incubation	35 jours.	35 jours.
Durée de l'accès.	12 jours.	19 jours.
	(8 jours de rémittences).	
Maximum	40°3	50 p. 1.000 gl. r.

Anisocytose peu marquée pendant 15 jours.

Quatrième passage. — Le veau A3 est saigné huit jours après son inoculation, c'est-à-dire vingt-sept jours avant le début de l'accès parasitaire d'anaplasmosse. Le sang recueilli est inoculé, à dose de 10 cent. cubes, dans la veine du veau A4. Le veau A4 fait un accès aigu normal de babésiellose, mais ne contracte pas l'anaplasmosse. Il n'est pas prémuni, car, réinoculé un an plus tard avec du virus prélevé sur un bovin (veau A60) en accès aigu d'anaplasmosse, il réagit par un accès franc, thermique et parasitaire.

Ainsi, le premier passage, effectué avec du virus de porteur chronique de *A. marginale*, a donné un accès d'anaplasmosse intense; les deuxième et troisième passages, opérés avec du virus prélevé au début de la période d'incubation de l'anaplasmosse, ont donné des accès bénins; le quatrième passage, dans les mêmes conditions, a inoculé trop peu de virus pour infecter le sujet.

Ces observations nous ont conduits à étudier systématiquement la prémunition contre l'anaplasmosse par l'inoculation de « virus d'incubation ». Nous avons cherché à déterminer : 1° le jour de l'incubation le plus favorable au prélèvement du virus devant servir de vaccin; 2° la dose de virus-vaccin à inoculer et la voie d'inoculation convenable; 3° la durée de conservation du virus *in vitro*.

D'expériences variées (sang prélevé aux douzième, sixième ou cinquième jours de la période d'incubation, inoculé par la voie veineuse ou par la voie sous-cutanée, à des doses allant de 1 à 100 cent. cubes, soit immédiatement après la saignée du donneur, soit deux ou trois jours plus tard) et portant sur 31 animaux, nous avons tiré les conclusions suivantes :

a) L'accès d'anaplasmose provoqué par le « virus d'incubation » est toujours plus bénin que l'accès d'anaplasmose du donneur, résultant de l'inoculation directe de « virus de chronique » (1).

b) Avec du virus prélevé le douzième jour de l'incubation et inoculé après trois jours de conservation à la température de de 19°-20°, les réactions sont généralement trop fortes, sans cependant entraîner la mort des animaux.

c) Avec du virus prélevé le sixième jour de l'incubation et inoculé après trois jours de conservation à la température extérieure (12°-21°), les résultats sont meilleurs qu'avec le même virus inoculé immédiatement.

d) Le moment le plus favorable pour le prélèvement du virus destiné à la vaccination prémunitive est le cinquième ou le sixième jour qui suit l'inoculation du donneur. Le virus garde sa virulence pendant trois jours au moins à la température extérieure, ce qui permet de l'expédier au loin pour les besoins de la pratique.

e) Les doses de virus-vaccin à inoculer sont comprises entre 2 et 5 cent. cubes. A doses égales, la voie sous-cutanée est préférable à la voie veineuse qui produit généralement des réactions plus fortes.

Voici un exemple de vaccination prémunitive contre l'anaplasmose effectuée avec du « virus d'incubation » provenant d'une souche particulièrement virulente.

Le veau neuf B16 est inoculé dans la veine avec 50 cent. cubes de sang du veau D16 qui a terminé un accès d'anaplasmose depuis un mois et demi. Le veau B16 contracte l'anaplasmose et en meurt :

Incubation parasitaire.	19 jours.
Durée de l'accès	9 jours (mort le 9 ^e jour).
Maximum des parasites.	450 p. 1.000 gl. r.

(1) Dans ces expériences, le « virus de chronique » a été inoculé aux donneurs à la dose uniforme de 50 cent. cubes (sang citraté), dans la veine.

Six jours après son inoculation (treize jours avant le début de son accès d'anaplasmose) le veau B 16 est saigné. Une partie du sang recueilli est conservée à 12-21° pendant trois jours, puis inoculée, à la dose de 5 cent. cubes, sous la peau de 3 animaux neufs. Chez ces 3 bovins, l'accès consécutif d'anaplasmose a présenté les caractères suivants :

	THERMIQUE	PARASITAIRE
Incubation. . . .	De 39 à 43 jours.	De 25 à 36 jours.
Durée de l'accès. .	De 1 à 3 jours.	De 46 à 53 jours.
Maximum	De 40° à 40°5.	De 20 à 220 p. 1.000 gl. r.

Guérison. Les numérations globulaires ont permis de reconnaître l'exis-

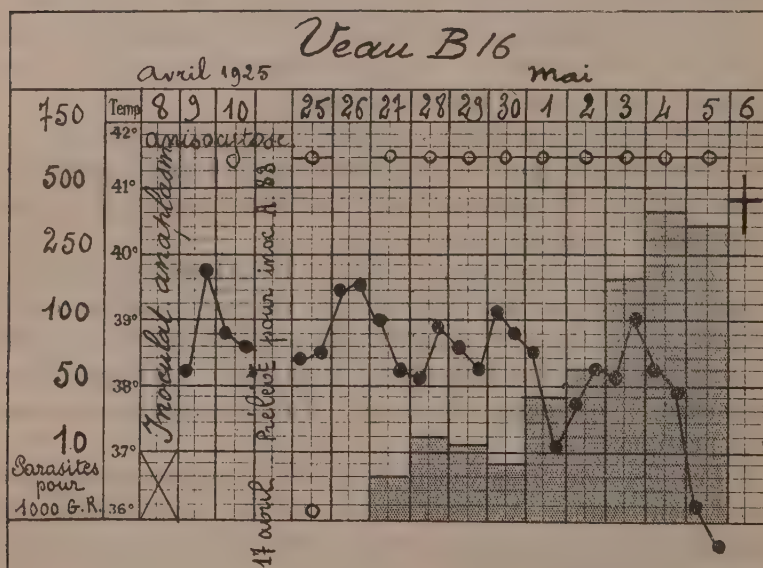


FIG. 13. — Accès mortel d'anaplasmose consécutif à l'inoculation de virus d'infection chronique.

tence d'une anémie marquée (moins de 3 millions de globules rouges par millimètre cube de sang) dans deux cas sur trois, mais l'état général des animaux n'a pas été sensiblement influencé.

2° PROCÉDÉ DU « VIRUS COLORÉ ». — Nous avons essayé, par ailleurs, d'atténuer la virulence d'*Anaplasma marginale* en le soumettant à l'action de matières colorantes, du bleu de méthylène, en particulier, qui n'est pas toxique pour le bœuf.

a) Le sang d'un bovin, contenant 3 anaplasmes p. 1.000

globules rouges, citralé, est additionné d'une solution de bleu de méthylène médicinal à 1 p. 100, dans la proportion de 1 partie de solution pour 9 parties de sang, et conservé à la température de 24°. Après huit, vingt-quatre, trente-deux et quarante-huit heures de conservation et de contact avec le bleu, le sang est inoculé sous la peau de 4 bovins, successivement, à la dose uniforme de 20 cent. cubes. Un témoin reçoit la même quantité de virus, *non coloré* et gardé aussi, pendant quarante-huit heures, à la température de 24°.

Les animaux inoculés avec du sang coloré pendant *trente-deux* et *quarante-huit* heures ne s'infectent pas et se montrent sensibles, plus tard, à une réinoculation d'épreuve. Le bovin, qui a reçu du sang coloré pendant *vingt-quatre* heures, réagit par un accès d'anaplasmose léger (durée : quinze jours ; maximum des parasites : 12 p. 1.000 globules rouges). Le bovin inoculé avec du sang coloré pendant *huit* heures fait un accès d'anaplasmose d'intensité à peu près égale à l'accès du témoin.

b) Un veau est saigné au cours d'un accès aigu d'anaplasmose (200 parasites p. 1.000

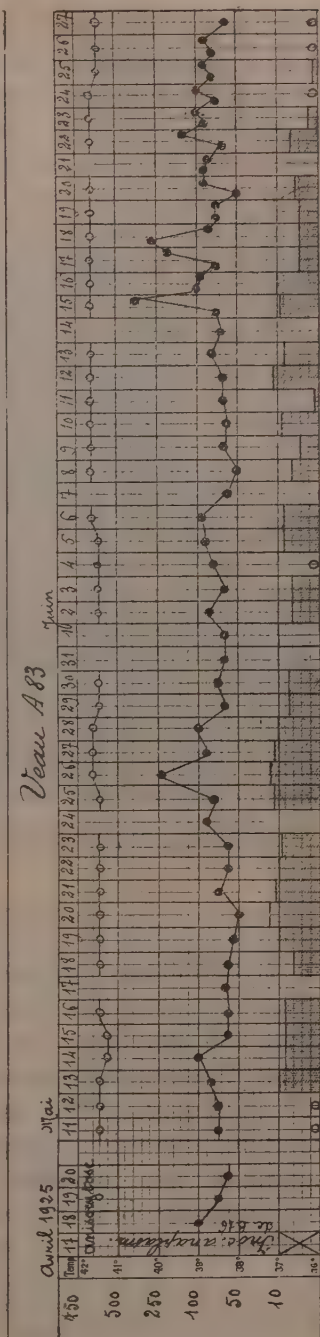


FIG. 14. — Accès d'anaplasmose consécutif à l'inoculation de « virus d'incubation » prélevé sur le veau précédent B 16.

globules rouges). Le sang, citraté, est mis en contact avec une solution de bleu de méthylène à 1 p. 100 dans la même proportion que précédemment. On conserve le mélange pendant vingt-quatre heures à 16°, puis on l'inocule sous la peau de 5 bovins neufs, à la dose de 20 cent. cubes. Cinq veaux témoins reçoivent la même quantité de virus, conservé de la même façon, mais *non coloré*.

Les 5 veaux témoins contractent normalement l'anaplasmose. Les 5 veaux inoculés avec des anaplasmes colorés ne réagissent pas. Eprouvés par la suite, 2 d'entre eux se montrent sensibles à la réinoculation; les trois autres non.

*
* *

En résumé, dans les conditions où nous avons opéré, la prémunition par le procédé du « virus coloré » a donné des résultats inconstants. La méthode de vaccination prémunitive qui, pour le moment, nous paraît utilisable dans la pratique, est celle qui consiste à employer comme virus-vaccin du sang prélevé sur un animal en incubation d'anaplasmose.

IV. — THEILÉRIOSE

à *Theileria dispar* Edm. Sergent, A. Donatien, L. Parrot,
F. Lestoquard, Edm. Plantureux et H. Rougebief, 1924.

A. — *Isolement du virus.*

Pour la theilériose comme pour les autres piroplasmoses, nous nous sommes attachés à n'expérimenter qu'avec des virus purs. L'association de *Th. dispar* avec des parasites d'espèce différente étant fréquente chez les bovins d'Algérie, il nous a fallu, à plusieurs reprises, isoler le virus par la méthode des passages successifs rapides *in vivo*. Dans une expérience, nous avons en outre employé avec succès le trypanobleu pour séparer *Th. dispar* de *P. bigeminum* auquel il était primitivement mêlé.

Le veau neuf C 16 est inoculé, dans le péritoine, avec 450 cent. cubes de sang de la vache *Cruchette*, atteinte d'un accès aigu de theilériose naturelle.

Treize jours plus tard, le veau C16 montre des *P. bigeminum* (1 p. 1.000 globules rouges). Le dix-septième jour, il commence un accès de theilériose. Au cinquième jour de cet accès (500 *Theileria* intraglobulaires p. 1.000 globules rouges; corps en grenade dans le sang), on lui injecte, dans la veine, 1 gr. 50 de trypanoblu. L'animal meurt sept heures après. On prélève aussitôt 1 cent. cube de sang de la jugulaire et on l'inocule sous la peau du



FIG. 15. — Jeune bovin atteint de theilériose : abatement.

veau neuf C49. Celui-ci contracte la theilériose après dix-huit jours d'incubation, mais non la piroplasmose vraie. La pureté de cette souche de *Th. dispar* a été vérifiée ensuite par de nombreux passages.

Pour contrôler la pureté des virus de theilériose dont nous nous servons, nous avons recours au procédé suivant, qui n'est qu'une application de l'épreuve de prémunition. Lorsque les veaux d'expérience ont terminé leur accès de theilériose, on leur inocule les parasites (*P. bigeminum* et *B. berbera* par exemple) qu'on suspecte d'être associés à *Th. dispar*. Si les veaux sont réellement infectés par ces parasites, ils ne réagissent nullement à l'épreuve, puisque prémunis. Si, au contraire, le virus *Theileria* est pur, les veaux se comportent comme des ani-

maux neufs et accusent une réaction thermique et parasitaire, de piroplasmose vraie ou de babésiellose, révélatrice. Une précaution à observer, c'est de prélever autant que possible les virus d'épreuve sur des animaux en accès aigu. Nous avons vu, en effet, que des *P. bigeminum* et des *B. berbera* provenant de porteurs chroniques de germes peuvent donner des infections très discrètes, qui passent souvent inaperçues, et même des infections tout à fait inapparentes.

Enfin, un moyen commode de se procurer du virus de theilériose consiste à utiliser la moelle des os des animaux morts de la maladie. Ce matériel offre l'avantage de pouvoir être expédié au loin et de permettre le diagnostic ou la transmission de la maladie à grande distance des lieux où elle sévit.

B. — *Evolution de la maladie expérimentale.*

VIRUS FIXE ET VIRUS LATENT.

Dans notre premier mémoire, nous avons décrit la theilériose à *Th. dispar* comme une infection purement aiguë, caractérisée par un accès fébrile et parasitaire d'incubation assez longue (dix-sept jours en moyenne) et suivi d'un état d'immunité vraie, stérilisante. Ainsi définie, la theilériose nord-africaine offrait de très grandes analogies avec la theilériose de l'Afrique australe, à *Theileria parva* (fièvre de la côte orientale), étudiée par A. Theiler et les auteurs sud-africains, laquelle évolue semblablement.

Les recherches que nous avons poursuivies de 1924 à 1927 (1) nous ont amenés à constater, contrairement à nos observations antérieures, que, du point de vue de la pathologie générale, la theilériose nord-africaine ne fait point exception à la règle commune aux autres piroplasmoses : le virus de la maladie peut exister durant de nombreux mois, dans l'organisme de bovins infectés, soit avant, soit après l'accès aigu, sans trahir sa présence par aucune manifestation clinique, c'est-à-dire à l'état latent. Il n'y a pas d'immunité antitheilé-

(1) Ces recherches sur la theilériose bovine ont nécessité l'observation continue, au laboratoire, de 708 animaux : 407 de race pure (races d'Aubrac, de Salers, bretonne), importés de France, et 301 algériens de race indigène ou croisée.

rique stérilisante ; la résistance que les animaux guéris d'un accès aigu opposent aux réinoculations infectantes est corrélative d'un état d'infection chronique, et, partant, relève de la prémunition. Il nous faut donc remanier la description de l'évolution de la theilériose expérimentale en tenant compte des faits nouveaux recueillis.

I. — *Etude du virus latent préfébrile (d'incubation) et du virus latent postfébrile.*

La durée de la période d'incubation, c'est-à-dire l'intervalle de temps compris entre l'inoculation du virus *Th. dispar* et l'apparition des symptômes aigus, fébriles, de l'accès de theilériose, a varié dans nos dernières expériences de douze jours à treize mois. Elle est inversement proportionnelle à la quantité de virus inoculée :

1° *L'inoculation de virus prélevé sur un animal en accès aigu de theilériose, c'est-à-dire à un moment où Th. dispar abonde dans l'organisme des bovins infectés (sous la forme de schizontes ou agamontes de Gonder), donne presque toujours un accès aigu après une période d'incubation de durée minima, remarquablement constante.* Cette « incubation courte » se retrouve dans tous les passages effectués en série de bovin à bovin, quel qu'en soit le nombre ; elle est commune à toutes les souches algériennes de theilériose. On peut donc dire que le « virus d'accès aigu » possède les caractères biologiques d'un virus fixe.

C'est ainsi que chez 554 bovins, inoculés avec du sang prélevé au cours d'accès aigus de theilériose, la durée de l'incubation a été de douze à vingt quatre jours (seize à dix-sept jours en moyenne). Pour la souche *Jacquot* — qui est celle que nous avons conservée le plus longtemps —, la durée moyenne de l'incubation s'est régulièrement maintenue dans les limites de temps ci-dessus, pendant 52 passages successifs, opérés en trente et un mois.

2° *Exceptionnellement, le virus d'accès aigu donne un accès aigu après une incubation de longue durée. Exemple :*

Le veau neuf *L 70* est inoculé, sous la peau, avec 20 cent. cubes de sang du veau *L 67* qui commence un accès de theilériose (1^{er} jour de température supérieure à 40°).

Le veau neuf *L 71* reçoit, sous la peau, la même quantité du même sang, à laquelle on ajoute 2 cent. cubes de suc ganglionnaire riche en corps en grenade (agamontes).

Résultats : le veau *L 70* présente un accès mortel de theilériose après quarante-cinq jours d'incubation et le veau *L 71* après dix-neuf jours seulement. Celui-ci guérit.

Cette observation, d'ailleurs unique, de longue incubation consécutive à l'inoculation immédiate de virus d'accès aigu, montre bien le rapport qui existe entre la dose de virus inoculée et la durée de l'incubation ; dose faible (cas du veau *L 70*), incubation longue ; dose forte (cas du veau *L 71*), incubation courte. Elle montre aussi qu'il n'y a aucune relation entre la durée de l'incubation et la durée de l'accès.

Dans deux cas où le virus a été prélevé au moment de l'accès mais a été conservé trente-neuf heures et quarante-huit heures *in vitro*, l'incubation a été, respectivement, de huit mois (génisse *B 89*), et de trois mois dix jours (veau *C 97*).

3° L'inoculation de virus prélevé, soit au cours de l'infection chronique qui suit l'accès aigu, soit pendant la période d'incubation, c'est-à-dire à un moment où *Th. dispar* est très rare dans l'organisme des bovins infectés, donne un accès aigu après une période d'incubation généralement très longue.

Exemples :

a) VIRUS PRÉLEVÉ APRÈS L'ACCÈS AIGU.

1. — Le veau *A 6* est inoculé dans le péritoine avec 600 cent. cubes de sang du veau *A 59*, qui a terminé un accès de theilériose depuis douze jours. Le veau *A 6* présente un accès de theilériose après une incubation de quarante-cinq jours.

2. — Le veau *C 71* est inoculé avec du sang du veau *B 16*, infecté d'anaplasmose et qui a terminé un accès de theilériose depuis un mois. Le veau *C 71* présente d'abord un accès d'anaplasmose, puis un accès de theilériose après une incubation de trois mois et demi.

3. — Le veau *A 84*, conservateur de virus pur (*P. bigeminum*) est réinoculé de *P. bigeminum* avec du sang du veau *D 21* qui a terminé un accès de theilériose depuis deux mois et demi. Le veau *A 84* présente un accès de theilériose après une incubation de trois mois et demi.

4. — 73 bovins sont inoculés de *P. bigeminum* et de *B. berbera*, le même jour, avec du sang provenant d'un veau, *B 46*, qui a terminé un accès de theilériose depuis quatre mois. Tous contractent normalement la piroplasmose et la babésiellose. En outre, 17 d'entre eux présentent un accès de theilériose après

une incubation de *quatre mois* (7 cas), *cinq mois* (4 cas), *sept mois* (1 cas), *neuf mois* (1 cas), *dix mois* (2 cas), *onze mois* (1 cas) et *treize mois* (1 cas).

5. — Les veaux C 1 et C 33 sont inoculés avec le sang des veaux 22 et A 56 qui ont terminé leur accès de theilériose depuis un et deux mois. Les veaux C 1 et C 33 présentent chacun un accès de theilériose après une incubation de *trois et six mois*.

b) VIRUS PRÉLEVÉ AVANT L'ACCÈS AIGU.

1. — Le veau B 14 est inoculé de *P. bigeminum*, le 20 avril 1925, avec du sang du veau A 84 (voir ci-dessus 3) qui, ayant reçu du sang du veau D 21 (ancien theilérié), se trouve en état d'« incubation longue ». Le veau B 14 contracte normalement la piroplasmose vraie, puis présente un accès de theilériose après une incubation de *deux mois et demi*.

2. — Le veau C 74 est inoculé, le même jour, avec du sang du même veau A 84. Le veau C 74 présente un accès de theilériose après une incubation de *six mois*.

3. — Le veau C 14 est inoculé de *B. berbera*, le 26 août 1924, avec du sang du veau A 86, conservateur de virus pur. Le 23 octobre 1925, il est « rechargé » de *B. berbera* avec du sang du veau B 40, inoculé lui-même, le 12 août 1925, avec du sang du veau B 46 qui avait terminé un accès de theilériose vingt-cinq jours auparavant. Le veau C 14 présente un accès de theilériose à partir du 28 juillet 1926, soit après une incubation de *neuf mois*.

N. B. — Le veau B 40, qui a servi d'intermédiaire, dans la transmission du virus de la theilériose, entre le veau B 46 et le veau C 14, est resté indemne jusqu'au 11 février 1927, date à laquelle une inoculation de virus fixe l'a infecté normalement.

Il ressort d'abord de ces faits que le virus de la theilériose existait encore dans l'organisme des bovins d'expérience jusqu'à quatre mois après leur accès aigu. On doit donc admettre que la theilériose nord-africaine comporte, comme les autres piroplasmoses, un stade d'infection chronique latente. D'autre part, le virus prélevé pendant la période postfébrile d'infection chronique ou pendant la période préfébrile d'incubation est transmissible aux animaux neufs, chez lesquels il continue sa vie latente et peut provoquer un accès aigu, après une incubation de durée généralement longue.

Nous tirons de l'ensemble de nos 28 observations d'*incubation longue* le résumé suivant :

25 bovins, inoculés expérimentalement avec du sang prove-

nant d'animaux guéris d'un accès de theilériose, ont présenté un accès de theilériose après une incubation anormalement longue, comparée à celle qui suit, d'ordinaire, l'inoculation de sang prélevé au cours de l'accès aigu. La durée de cette incubation longue a varié de quarante-cinq jours à treize mois.

Les animaux donneurs de virus avaient terminé leur accès de douze jours à quatre mois avant la prise de sang destiné aux inoculations.

Pour 25 bovins, l'infection a été transmise directement du donneur au receveur. Pour 3 animaux, elle s'est faite indirectement par un tiers bovin interposé entre le donneur et le receveur. Dans une expérience, le bovin intermédiaire se trouvait lui-même au trentième jour d'une « incubation longue », de trois mois et demi de durée, au moment où il a été saigné en vue de l'inoculation de deux receveurs.

A plusieurs reprises, le même donneur de virus s'est trouvé à l'origine des cas de theilériose à incubation longue. Un veau, entre autres, a contaminé de la sorte 18 bovins, dont un indirectement, par l'intermédiaire d'un animal de passage qui a transmis le virus sans montrer lui-même aucun signe d'infection pendant dix-huit mois.

3 bovins ont également présenté un accès de theilériose à incubation longue à la suite de l'inoculation du sang prélevé au cours même de l'accès aigu. Une fois, l'inoculation avait été faite aussitôt après la saignée du donneur et, deux fois, après conservation du sang pendant trente-neuf à quarante-huit heures à 5° et 18°-20°.

Le contraste entre ces incubations longues et l'incubation normale, si régulière, consécutive à l'inoculation de virus d'accès aigu, nous a amenés à nous demander s'il ne s'agissait pas, dans ces observations, de cas dus à une contamination naturelle intercurrente, causée par des tiques que le fourrage aurait apportées dans nos étables. De fait, nous avons eu l'occasion de constater deux accès spontanés de theilériose chez deux animaux qui n'avaient jamais reçu de sang suspect, et un troisième chez un veau encore vierge de toute inoculation. Pour ces bovins, l'hypothèse de la contamination par des tiques est plausible. On ne peut cependant pas écarter absolument la

possibilité d'une inoculation accidentelle, opérée par des instruments de laboratoire souillés de virus (ciseaux employés pour la prise de sang journalière, par exemple). Nous savons, en effet, qu'une très petite quantité de matière virulente (telle l'eau de lavage d'un culot de sang après une troisième centrifugation) suffit à donner la theilériose (1). Mais, excepté ces trois cas d'accès spontanés dont l'origine reste obscure, les accès à incubation longue que nous venons de décrire ne peuvent s'expliquer que par l'existence d'une vie latente de *Theileria dispar*, au stade préfébrile comme au stade postfébrile. Leur fréquence, les conditions dans lesquelles nous expérimentons, à savoir sur des bovins importés de France, maintenus en stabulation permanente dès leur débarquement en Algérie et étroitement surveillés, ne permettent pas d'autre conclusion. Au surplus, nos expériences sont à rapprocher des observations publiées par E. Brumpt en 1923 et 1924, d'« accès pernicieux » de theilériose apparus à longue échéance, en Normandie et en Angleterre, chez des bovins inoculés avec un virus d'origine tunisienne (2).

Une dernière question se pose. Le « virus latent », qui produit des accès à incubation longue, est-il de même nature que le « virus fixe » des accès aigus? La réponse ne peut être qu'affirmative, car : 1° le virus fixe a donné, dans certaines conditions, des accès aigus après une période d'incubation très longue (cas du veau *L 70*, par exemple, cité plus haut); 2° du virus prélevé au cours d'un accès aigu survenant après une longue période de latence s'est comporté comme un virus fixe dans les passages en série auxquels nous l'avons employé. Une de nos souches de theilériose, la souche *Kouba*, n'a pas d'autre origine.

II. — Absence de rechutes.

Les bovins guéris de theilériose au laboratoire (plus de 500) n'ont jamais montré, au stade d'infection latente postfébrile, de rechutes parasitaires par les formes intraglobulaires.

(1) Voir notre premier mémoire.

(2) E. BRUMPT, Les theilérioses mortelles du bassin méditerranéen sont dues à *Theileria mutans*. *Ann. parasit. hum. et comparée*, 1, n° 1, avril 1923, p. 16-53. Les piroplasmoses des bovidés. I. Les theiléries. *Ibid.*, 2, n° 4, p. 340-353.

III. — *Etude du virus fixe.*

1° RECHERCHE DU VIRUS FIXE CHEZ LES BOVINS INFECTÉS. — Nous avons essayé de préciser le moment à partir duquel le virus de la theilériose prend les caractères d'un virus fixe, à incubation courte régulière, dans l'organisme des bovins inoculés, et le moment à partir duquel il perd ces mêmes caractères. La recherche a porté d'une part sur le sang, d'autre part sur les ganglions lymphatiques.

a) *Recherche du virus fixe dans le sang.* — Pendant la période d'incubation, le virus fixe peut tantôt exister dans le sang de la circulation périphérique dès le onzième jour qui précède l'accès (quatrième jour de l'incubation) et tantôt manquer deux jours avant l'accès (dix-neuvième jour de l'incubation) suivant les animaux. Il n'y a là aucune règle constante.

Le veau *S 34* est inoculé, sous la peau, avec 20 cent. cubes de sang du veau *D 10*, prélevé le quatrième jour de l'incubation d'un accès de theilériose qui commencera onze jours plus tard. Le veau *S 34* présente un accès de theilériose après douze jours d'incubation et en meurt.

Les veaux *C 96* et *C 97* sont inoculés dans la veine avec 50 cent. cubes de sang du veau *C 62*, prélevé le dix-neuvième jour de l'incubation d'un accès de theilériose qui commencera deux jours après. Les veaux *C 96* et *C 97* n'accusent aucune réaction. L'un d'eux, réinoculé six mois plus tard, contracte la theilériose et en meurt.

Pendant tout le cours de l'accès de theilériose, le sang circulant des malades contient du virus transmissible avec courte incubation. Nous n'avons jusqu'ici constaté qu'une seule exception sur 555 expériences (cas du veau *L 70*).

Passé l'accès aigu fébrile, le sang de la circulation périphérique ne renferme généralement plus assez de virus pour provoquer un accès aigu dans les délais normaux de l'incubation courte. Sur 56 animaux guéris d'un accès de theilériose et dont le sang a été prélevé et inoculé à des bovins neufs de deux jours à neuf mois après la défervescence, un seul, saigné le sixième jour, avait encore, dans la circulation périphérique, du virus présentant les caractères du virus fixe.

b) *Recherche du virus fixe dans les ganglions lymphatiques.* — L'inoculation du produit de broyage de ganglion lymphatique (préscapulaire) prélevé, sur le vivant, pendant la période

d'incubation (dix-huit jours avant le début de l'accès de theilériose) et, chez un autre sujet, quarante jours après la défervescence, n'a pas donné d'accès aigu à incubation courte à 2 animaux neufs. Dans le second cas (veau *S 1*), le ganglion, encore hypertrophié, contenait cependant de très rares corps en grenade (agamontes), visibles à l'examen microscopique.

2° CONSERVATION DU VIRUS FIXE IN VITRO. — Dans le sang conservé *in vitro*, le virus d'accès aigu peut garder ses caractères de virus fixe pendant quatre jours au moins, à la température de 18° à 24°, et pendant huit jours à la température de 42° à 44°. Dans la moelle osseuse, la conservation à 8° pendant huit jours ne modifie pas le virus; au bout de quatorze jours, l'inoculation de ce matériel à un animal neuf ne transmet plus la theilériose dans les délais de l'incubation courte.

3° VIRULENCE DU VIRUS FIXE. — Sur 493 animaux inoculés expérimentalement avec du virus d'accès aigu et ayant contracté la theilériose, 174 ont succombé, soit 35 p. 100. L'inoculation sous-cutanée a causé 157 morts sur 444 accès (35 p. 100), l'inoculation intraveineuse 9 morts sur 21 accès (43 p. 100), l'inoculation intrapéritonéale 7 morts sur 26 accès (27 p. 100), l'inoculation intradermique 1 mort sur 2 accès. De 2 virus d'origine différente, inoculés sous la peau, l'un (souche *Babette*) a tué 3 animaux sur 48 accès (6 p. 100), l'autre (souche *Jacquot*) 85 sur 198 (42 p. 100). A doses égales, le second s'est constamment montré beaucoup plus virulent que le premier.

4° VARIATIONS DE LA VIRULENCE SUIVANT LA VOIE D'INTRODUCTION. — Avec toutes les souches, l'inoculation intraveineuse donne une infection nettement plus grave que l'inoculation sous-cutanée; aussi injectons-nous le sang infecté dans la veine lorsque nous voulons accroître la virulence de *Th. dispar*. L'inoculation intradermique paraît aussi l'exalter.

C. — *Évolution du parasite.*

Nous examinerons successivement : 1° la répartition des corps en grenade (*Plasmakugeln* de R. Koch, agamontes et

gamontes de R. Gonder) dans l'organisme, leurs rapports avec l'accès thermique, leur persistance après la défervescence; 2° l'évolution des petites formes intraglobulaires (gamétocytes de R. Gonder).

1° CORPS EN GRENADE.

a) RÉPARTITION. — Sur 485 animaux inoculés de theilériose, dont nous avons ponctionné le *foie* au cours de l'accès, 469 présentaient des corps en grenade dans cet organe, soit 97 p. 100 (1). La même recherche a été constamment négative chez 177 bovins indemnes de theilériose et ponctionnés suivant la même technique. Sur 75 ponctions de ganglions lymphatiques superficiels (préscapulaires ou précuraux), 36 ont été positives (48 p. 100); sur 58 ponctions de rate, 19 (33 p. 100). Après la mort, les frottis d'organes ont montré des corps en grenade dans les proportions suivantes :

	RÉSULTATS positifs	EXAMENS
Foie	33	35
Ganglions	14	22
Rate	28	35
Reins	23	30
Surrénales	9	11
Poumons	7	11
Moelle des os	7	10
Myocarde	5	7
Cerveau	2	4
Sang périphérique	17	20

Chez l'animal vivant comme à l'autopsie, c'est donc dans le foie qu'on trouve le plus fréquemment les corps en grenade de *Th. dispar*, et la ponction du foie constitue un excellent moyen de diagnostic ou de confirmation du diagnostic de la theilériose nord-africaine, comme nous l'avons déjà signalé. L'opération est tout à fait inoffensive : nous l'avons pratiquée plus d'un

(1) La proportion des ponctions du foie négatives chez les bovins en accès (3 p. 100) n'a aucune signification absolue et l'on ne saurait en déduire que les corps en grenade peuvent manquer au cours d'accès de theilériose légitimes. Les chiffres rapportés doivent s'entendre d'une seule ponction, effectuée au moment où la température des animaux inoculés dépasse 40°, et de l'examen microscopique d'un seul frottis de la pulpe hépatique obtenue. Il suffit, en effet, de multiplier les ponctions et les examens pour diminuer la fréquence des résultats négatifs.

millier de fois et souvent répétée à plusieurs reprises sur le même animal, sans aucun accident.

Si l'on ponctionne simultanément, chez les mêmes animaux, le foie et les ganglions, on constate que les corps en grenade sont, en général, décelables plus tôt dans le foie que dans les ganglions lymphatiques superficiels. L'inverse a été observé



FIG. 16. — Bovin atteint de theilériose. Hypertrophie du ganglion précrural droit.

cependant pour 3 souches de *Th. dispar*, sur 17 étudiées, pendant un certain nombre de passages successifs. Ultérieurement ces 3 souches se sont comportées comme les autres. Nous verrons plus loin que la constatation plus fréquente et plus précoce des corps en grenade dans le foie distingue la theilériose à *Th. dispar* de la theilériose à *Th. parva*. Chez les animaux inoculés par la voie veineuse, ces corps se montrent plus tôt dans la rate que dans le foie et en plus grand nombre.

L'apparition des corps en grenade dans le sang circulant en nombre tel que l'examen d'une seule préparation suffise à les

déceler caractérise les accès violents ; elle est ordinairement un signe de gravité. Ainsi, sur 100 veaux infectés de theilériose expérimentale, 48 ont présenté des corps en grenade dans la circulation périphérique, parmi lesquels 34 ont succombé.

b) RAPPORTS DES CORPS EN GRENADE AVEC L'ACCÈS FÉBRILE. — En règle générale, les corps en grenade sont décelables dans les organes, et en particulier dans le foie, dès le premier jour de la fièvre et pendant toute la durée de celle-ci. (Nous avons

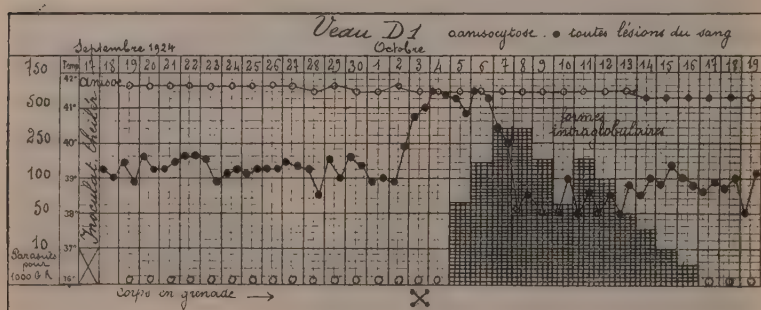


FIG. 17. — Theilériose. Accès de première invasion, thermique et parasitaire, typique. (La croix au-dessous du graphique indique la présence de corps en grenade dans le foie.)

dit précédemment pour quelles raisons de technique les ponctions exploratrices restent parfois négatives.) Exceptionnellement, on rencontre ces formes parasitaires chez des animaux inoculés qui n'accusent pas d'élévation thermique ou dont la fièvre n'atteint pas 40°, la ponction exploratrice étant pratiquée vers la fin présumée de la période d'incubation. Nous retrouverons ces « accès parasitaires sans accès thermique » au chapitre de la prémunition.

c) PERSISTANCE DES CORPS EN GRENADE APRÈS LA DÉFERVESCENCE. — L'accès aigu terminé, les corps en grenade ne peuvent plus être mis en évidence, en général, chez le vivant, avec les moyens d'exploration dont nous disposons. Toutefois, dans un cas (veau S 1), nous avons pu voir un corps en grenade typique dans un frottis de ganglion lymphatique enlevé, par

opération chirurgicale, quarante jours après l'accès de theilériose.

Dans un autre cas (veau *L 92*), nous avons trouvé un corps en grenade (agamonte) dans la rate, 28 jours après la fin de l'accès de theilériose.

Nous avons signalé autrefois la présence de corps en grenade (en nombre infiniment petit) dans les organes (poumons, rate, ganglions, reins) de bovins, en dehors d'accès fébriles (1).

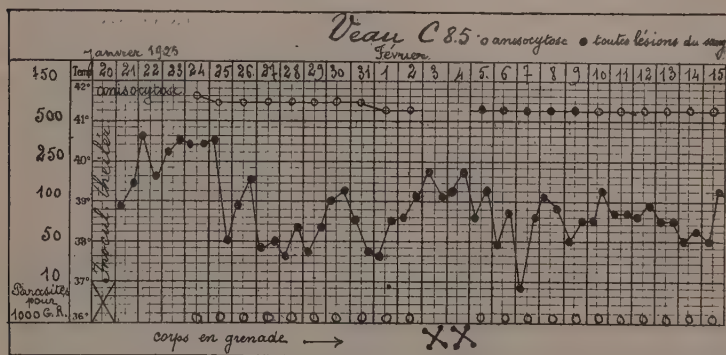


FIG. 18. — Theilériose. Réaction apyrétique de première invasion (corps en grenade dans le foie).

Ces observations permettent de penser qu'au stade d'infection chronique, les corps en grenade deviennent extrêmement rares dans les organes, d'où la difficulté de les découvrir.

2° FORMES INTRAGLOBULAIRES.

Les accès de theilériose graves s'accompagnent toujours de l'apparition, dans la circulation périphérique, de formes intraglobulaires nombreuses. Elles manquent dans 25 p. 100 des cas environ ; il s'agit alors d'accès bénins, à moins que la mort de l'animal ne soit survenue dans les deux ou trois premiers jours de la fièvre.

Cette inconstance de la production des formes intraglobulaires contraste avec la fréquence de la constatation des corps

(1) Bull. Soc. Path. exot., t. 12, 12 févr. 1919, pp. 103-120.

en grenade dans les organes. Il semble bien que l'accès fébrile est étroitement lié à la pullulation des « agamontes » et que la formation des « gamontes » et par suite des « gamétocytes » (suivant la conception de Gonder) avorte souvent. Autrement dit, le corps en grenade nous apparaît comme l'élément pathogène par excellence du virus theilérique. De l'abondance ou de la rareté de cet élément dépendent la durée de l'incubation, l'acuité des symptômes (de la fièvre entre autres), l'intensité des désordres physio-pathologiques et des lésions anatomiques. Il commande, en somme, toute l'évolution de la maladie. Par là s'explique qu'on puisse observer tous les intermédiaires entre l'accès de theilériose à peine ébauché, apyrétique ou presque, et l'accès suraigu qui tue en quelques heures.

D. — *Notes cliniques diverses.*

1° VIGUEUR APPARENTE DES BOVINS EN ACCÈS DE THEILÉRIOSE. — On observe souvent, surtout au pâturage, des accès aigus de theilériose qui ne semblent pas affecter l'état général des animaux atteints. De jeunes bovins, fébricitants (41°) et porteurs de nombreux parasites intraglobulaires, conservent toute leur vivacité. La proportion des malades, à la chaude saison, dans les régions contaminées est certainement bien supérieure à celle que le simple examen clinique direct permet de reconnaître. Ceci explique les cas dits de « mort subite » qui se produisent assez fréquemment.

2° AVORTEMENT CHEZ LES VACHES. — La theilériose, comme toutes les infections à hématozoaires, provoque fréquemment l'avortement des femelles en gestation. Ainsi, dans un groupe de 26 vaches vivant aux champs, et qui n'étaient pas toutes pleines au moment où la maladie sévissait, 3 ont avorté au cours d'un accès. Bien que les éleveurs algériens ne paraissent pas y prêter grande attention, il y a là une cause de pertes économiques importantes.

3° HÉMOGLOBINURIE. — Dans un cas mortel de theilériose (virus pur), nous avons constaté, à l'autopsie, de l'hémoglobi-nurie vraie, sans hématurie.

4° GANGRÈNES CUTANÉES MULTIPLES. — Chez des veaux atteints de theilériose naturelle grave, on voit parfois se produire des lésions particulières de la peau siégeant aux oreilles, au cou, aux ischions, aux coudes, à la face interne des cuisses et des jarrets. Il s'agit d'une gangrène sèche, localisée, du tégument,



FIG. 49. — Theilériose. Gangrènes cutanées multiples des oreilles.

avec sillon d'élimination laissant, après la chute des eschares, des ulcérations longues à guérir. Ces lésions résultent sans doute d'embolies parasitaires.

5° PRONOSTIC DE L'ACCÈS AIGU. — Certains facteurs ont une influence marquée sur l'évolution de l'accès aigu de theilériose, soit qu'ils en augmentent la gravité, soit qu'ils l'atténuent au contraire. Le pronostic de la maladie expérimentale dépend, pour une grande part :

a) De l'âge des sujets. Jusqu'à six mois environ, les jeunes animaux bien portants supportent remarquablement l'inoculation expérimentale.

b) De l'*état de lactation*, pour les femelles. Les vaches laitières de race fine, gardées en stabulation permanente, c'est-à-dire placées dans des conditions de vie anormales, présentent souvent des réactions plus graves que les veaux, bœufs ou génisses inoculés avec les mêmes virus.

c) De l'*état général* des animaux. Chez les bovins malingres



FIG. 20. — Theilériose, Abattement, larmoiement.

ou débilités, la mortalité est, naturellement, importante. En outre, ils présentent parfois des réactions atypiques (mort vers la fin de la période d'incubation, sans fièvre).

d) Du *travail* auquel les animaux sont soumis. La mortalité est nettement plus forte parmi les bœufs qui labourent que chez ceux que l'on laisse au repos pendant l'accès.

e) De la *température* ambiante. Les coups de siroco survenant au moment où les animaux réagissent à l'inoculation aggravent l'accès et augmentent la mortalité.

Nous avons remarqué, d'autre part, que l'absence des réactions sanguines : anisocytose, polychromasie, basophilie, appa-

rition d'hématies nucléées, qui sont de constatation régulière dans les jours suivant l'accès aigu, est d'un mauvais pronostic.

6° THEILÉRIOSE CONGÉNITALE. — Dans la rate d'un veau nouveau-né, mort une semaine après sa naissance et qui présentait, à l'autopsie, les lésions caractéristiques de la theilériose, nous avons trouvé des corps en grenade, libres et intracellulaires. L'observation de ce nouveau cas de theilériose congénitale a été publiée par A. Magneville (1).

E. — *Essais de traitement.*

a) TRAITEMENT MÉDICAMENTEUX. — Nous avons signalé antérieurement l'inefficacité de la *quinine*, de l'*émétine* et du *trypanoblu* contre la theilériose. Nous avons expérimenté, depuis, le *chlorhydrate d'émétine*, le *sulfarsénol*, l'*arsénobenzol* et le produit 270 de Fourneau, en injections intraveineuses, également sans succès; la décoction d'écorce de *racines de tamaris* prise par ingestion s'est montrée complètement inefficace.

b) TRAITEMENT SPÉCIFIQUE. — De nouvelles expériences nous ont montré que le sang total et le sérum des animaux guéris d'un accès aigu à *Th. dispar* ne possèdent pas de propriétés actives, préventives ou curatives, à l'égard de la theilériose.

F. — *Identité spécifique de Theileria dispar.*

1° COMPARAISON AVEC *Gonderia mutans* (Theiler, 1906).

Nous avons continué à réunir les éléments d'une comparaison entre *Theileria dispar* et *Gonderia mutans* afin de préciser les ressemblances ou les différences qui existent entre ces deux parasites.

a) Ainsi que nous l'avons déjà montré, les accès de première invasion de la gondériose, consécutifs à l'inoculation expérimentale de sang infecté, sont des accès parasitaires sans réaction thermique, sans symptômes morbides, et toujours bénins.

(1) *Bull. Soc. Path. exot.*, 18, 11 nov. 1925, p. 274-272.

L'accès de theilériose, au contraire, s'accompagne régulièrement — sauf exception très rare — d'une fièvre élevée; il est souvent grave et souvent mortel.

b) La durée moyenne de l'accès parasitaire de gondériose — lorsqu'il n'y a pas infection chronique d'emblée — atteint trente-trois jours (minimum : vingt-trois jours; maximum : quarante jours, d'après nos observations). Celle de l'accès parasitaire de theilériose (formes intraglobulaires) est de six jours (minimum : un jour; maximum : dix-huit jours).

c) L'intensité du parasitisme au cours de l'accès de gondériose varie de 4 à 175 parasites intraglobulaires pour 1.000 globules rouges. Elle n'atteint jamais les chiffres énormes constatés dans certains accès de theilériose (jusqu'à plus de 4.000 éléments intraglobulaires pour 1.000 globules rouges).

d) Passé l'accès parasitaire de première invasion, la réapparition intermittente de formes intraglobulaires dans la circulation périphérique est de règle dans la gondériose, au stade d'infection chronique. Cette réapparition prend parfois le caractère de véritables « rechutes parasitaires », surtout au printemps. Passé l'accès aigu de theilériose, nous n'avons jamais vu, dans le sang circulant des animaux guéris, de formes intraglobulaires du type *Theileria dispar* (petites formes rondes, éléments en épingle ou en virgule).

e) Nous n'avons jamais constaté l'existence de corps en grenade dans les organes (foie, rate, ganglions lymphatiques superficiels) au moment des accès parasitaires de gondériose, même les plus intenses. Il est vrai que les corps en grenade ne sont pas décelés non plus pendant certains accès légers de theilériose, mais, dans ces accès légers, les formes intraglobulaires n'apparaissent qu'en très petit nombre (2 à 10 p. 1.000 globules rouges, par exemple). En d'autres termes, à accès parasitaire d'intensité égale, les corps en grenade abondent s'il s'agit de theilériose; ils manquent, au contraire, s'il s'agit de gondériose, comme si les formes intraglobulaires de *G. mutans* dériveraient d'éléments schizogoniques tout autres.

f) La transmission du virus de gondériose par passages successifs n'en augmente pas la virulence. Quel que soit le nombre des passages, l'accès de première invasion conserve ses caractères de bénignité. Il y a toujours infection sans maladie.

g) Nous avons vérifié à nouveau que l'inoculation simultanée ou successive de *G. mutans* et de *Th. dispar* à des animaux neufs détermine des infections contemporaines ou successives de gondériose et de theilériose qui évoluent chacune comme si elle était seule. Les animaux infectés de *G. mutans* sont sensibles à la theilériose, au stade de première invasion aussi bien qu'au stade chronique; les bovins guéris d'un accès aigu de theilériose contractent la gondériose.

En somme, dans les conditions expérimentales, tout se passe comme si *Gonderia mutans* et *Th. parva* représentaient deux virus distincts.

2° COMPARAISON

ENTRE *Theileria dispar* et *Theileria parva* (Theiler, 1904).

Grâce à l'obligeance des D^{rs} A. Theiler et P. J. du Toit, de Prétoria, qui ont bien voulu nous envoyer des tiques (*Rhipicephalus appendiculatus* Neumann) infectés par *Theileria parva*, nous avons pu comparer la theilériose nord-africaine à la « fièvre de la côte orientale », de l'Afrique australe. Ayant publié ici même (1) les résultats de nos expériences sur ce sujet, nous nous bornerons à les résumer brièvement.

a) Du point de vue clinique et anatomo-pathologique, l'accès aigu expérimental de theilériose nord-africaine et l'accès aigu de theilériose sud-africaine, transmises par l'inoculation de sang ou d'organes infectés, évoluent semblablement. L'anémie est cependant moins marquée, en général, dans la theilériose sud-africaine expérimentale.

b) L'accès aigu de theilériose sud-africaine transmise par les tiques paraît plus grave que l'accès naturel de theilériose nord-africaine et entraîne une mortalité plus grande.

c) L'hypertrophie de la rate est moins constante et moins accusée dans la theilériose sud-africaine transmise par les tiques que dans la theilériose nord-africaine, naturelle ou expérimentale.

d) Les corps en grenade sont décelables plus tôt dans les

(1) Ces *Annales*, 41, mai 1927.

ganglions lymphatiques que dans le foie quand il s'agit de *Theileria parva*; c'est l'inverse pour *Theileria dispar*.

e) En ce qui concerne les formes parasitaires intraglobulaires, la proportion des parasites « en bâtonnet » est beaucoup plus considérable dans le cas de *Th. parva* (81 p. 100) que dans le cas de *Th. dispar* (8 p. 100).

f) Les animaux guéris d'un accès aigu de theilériose nord-africaine contractent régulièrement la theilériose sud-africaine comme des animaux neufs, et réciproquement.

g) L'hôte vecteur naturel de *Th. parva*, *Rh. appendiculatus*, ne transmet pas *Th. dispar*.

Il y a donc lieu de considérer *T. dispar* et *Th. parva* comme deux espèces distinctes.

G. — *Prémunition* (1).

A la suite de nos premières expériences, nous avons été amenés à conclure qu'une atteinte de theilériose nord-africaine confère une immunité stérilisante, solide et durable, comme il arrive pour la theilériose sud-africaine à *Theileria parva*, d'après A. Theiler et ses collaborateurs. Cette affirmation était basée sur 44 épreuves de réinoculation, portant sur 21 bovins qui avaient terminé un accès aigu de quinze jours à neuf mois auparavant. Aucun de ces 21 animaux n'avait accusé de récurrence, thermique ou parasitaire. Toutes les réinoculations étaient alors faites *par la voie péritonéale*.

Poursuivant nos recherches, nous nous sommes rendu compte qu'un certain nombre d'animaux présentaient un nouvel accès de theilériose lorsque la réinoculation d'épreuve était pratiquée par la voie sous-cutanée ou par la voie veineuse. Ces observations ont remis en question le problème de l'immunité dans la maladie. Nous avons donc essayé de le résoudre en multipliant les expériences de réinoculation.

Sur 280 animaux guéris d'une première atteinte, puis réinoculés de theilériose (virus fixe), 61 ont accusé un nouvel accès,

(1) Sur 407 bovins de race pure importés en France, 3 seulement n'ont pas contracté la theilériose à la suite de plusieurs inoculations (jusqu'à 6) de virus fixe.

soit 22 p. 100. L'évolution de ces accès de réinoculation a donné lieu aux remarques ci-après :

A. — ACCÈS THERMIQUE DE RÉINOCULATION.

L'incubation de l'accès thermique de réinoculation a varié de treize à soixante et un jours (dix-huit jours en moyenne);

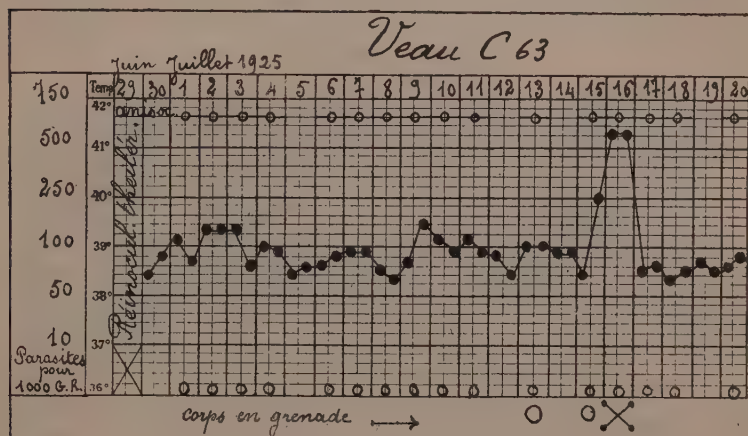


FIG. 21. — Theilériose. Accès fébrile consécutif à une réinoculation (corps en grenade dans le foie).

sa durée, de un à huit jours (trois jours en moyenne); le *maximum thermique*, de 40° à 42°. La température a atteint ou dépassé 41° vingt-neuf fois sur 56 animaux.

B. — ACCÈS PARASITAIRE DE RÉINOCULATION.

Les *corps en grenade*, recherchés par ponction des organes, dès le début de l'accès thermique, chez 54 animaux, ont été trouvés de quinze à soixante-deux jours après l'inoculation (dix-neuf jours en moyenne) et dans tous les cas. L'*accès parasite*, c'est-à-dire la présence des petites formes intraglobulaires dans le sang circulant, a duré de un à neuf jours.

Chez 5 animaux, soit chez 8 p. 100, l'accès a été apyrétique et n'a été reconnu que grâce à la ponction du foie qui a permis de déceler la présence de corps en grenade dans cet organe.

Sur 64 accès de réinoculation, 9 (soit 15 p. 100) se sont terminés par la mort, survenue du troisième au huitième jour de l'accès thermique dans 8 cas et quinze jours après la fin de l'accès, pour le neuvième.

En résumé : Comparé à l'accès de première invasion, l'accès de réinoculation a une incubation sensiblement plus longue et surtout une durée moyenne plus courte (trois jours au lieu de cinq). Les réactions apyrétiques, exceptionnelles quand il

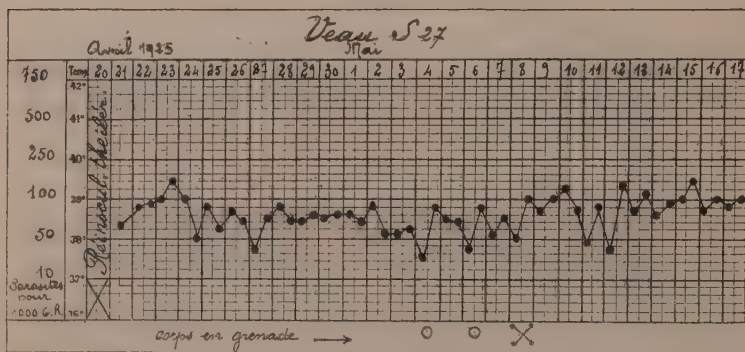


FIG. 22. — Theilériose. Accès apyrétique (corps en grenade dans le foie) consécutif à une réinoculation.

s'agit de primo-inoculations (3 observations sur 493 expériences), se rencontrent assez fréquemment dans les récidives (8 p. 100 des cas) [1]. La mortalité globale, qui atteint 35 p. 100 à la suite des accès de première invasion, n'est que de 15 p. 100 à la suite des accès de réinoculation. De plus, si l'on rapproche les pertes causées par les primo-inoculations pratiquées avec une souche de theilériose très virulente (souche *Jacquot*) des pertes résultant des réinoculations faites avec le même virus, on arrive aux chiffres suivants :

- | | |
|---|---------------------|
| I. Nombre de primo-inoculations | 198 |
| Nombre de morts | 35, soit 42 p. 100. |
| II. Nombre de réinoculations | 230 |
| Nombre de morts | 9, soit 4 p. 100. |

(1) En raison de la difficulté de découvrir les corps en grenade chez l'animal vivant, quand ils sont rares, on doit penser qu'un certain nombre d'« accès parasitaires sans accès thermiques » passent inaperçus.

On voit par là qu'un premier accès de theilériose confère aux animaux guéris une résistance remarquable à l'égard des réinoculations expérimentales les plus sévères.

C. — CONDITIONS DES ACCÈS DE RÉINOCULATION EXPÉRIMENTAUX.

L'existence des accès de réinoculation de theilériose étant reconnue, il restait à préciser les conditions qui président à leur apparition chez certains animaux.

1° FRÉQUENCE ET GRAVITÉ DES ACCÈS SUIVANT L'INTERVALLE DE TEMPS COMPRIS ENTRE LA PREMIÈRE INOCULATION ET LA RÉINOCULATION.

— La fréquence des accès de réinoculation augmente à mesure que la réinoculation est plus éloignée dans le temps de la première inoculation. 183 réinoculations opérées de un à quatre mois après la primo-inoculation donnent 19 accès, soit 10 p. 100; 73 réinoculations opérées après cinq à huit mois donnent 28 accès, soit 36 p. 100; 24 réinoculations opérées après neuf à dix-sept mois donnent 13 accès, soit 54 p. 100. Aucun accès de réinoculation mortel n'a été observé avant le quatrième mois.

2° FRÉQUENCE DES ACCÈS DE RÉINOCULATION SUIVANT LE MATÉRIEL VIRULENT EMPLOYÉ : *a*) POUR LA PRIMO-INOCULATION ET *b*) POUR L'ÉPREUVE DE RÉINOCULATION :

		ACCÈS de réinoculation	
<i>a</i>) Sur	14 animaux inoculés avec du ganglion	1	
— 2 —	— de la rate	0	
— 1 —	— de la moelle osseuse	1	
— 33 —	— du foie	0	
— 208 —	— du sang	57	
—	18 animaux contaminés dans la nature	0	

		ACCÈS de réinoculation	
<i>b</i>) Sur	3 animaux réinoculés avec du ganglion	0	
— 14 —	— de la rate	0	
— 25 —	— du foie	0	
— 234 —	— du sang	59	

3° FRÉQUENCE DES ACCÈS DE RÉINOCULATION SUIVANT LA VOIE D'INTRODUCTION DU VIRUS UTILISÉE : a) POUR LA PRIMO-INOCULATION ET b) POUR L'ÉPREUVE DE RÉINOCULATION :

				ACCÈS de réinoculation
a) Sur	68 animaux	<i>inoculés</i>	dans le péritoine	6
—	175	—	— sous la peau	50
—	13	—	— dans la veine	2
—	2	—	— dans le derme	1

				ACCÈS de réinoculation
b) Sur	63 animaux	<i>réinoculés</i>	dans le péritoine	1
—	209	—	— sous la peau	58
—	3	—	— dans la veine	0

Il est remarquable que presque tous ces accès ont été observés chez des animaux éprouvés par une réinoculation *sous-cutanée*. La réinoculation par la voie péritonéale n'a causé d'accès que dans un seul cas (sur 63 expériences), malgré les grosses quantités de matériel virulent injectées à différents animaux (jusqu'à 4.500 cent. cubes de sang d'accès aigu).

4° FRÉQUENCE DES ACCÈS DE RÉINOCULATION SUIVANT LA DOSE DE VIRUS RÉINOCULÉE A L'ÉPREUVE. — La quantité de virus réinoculée n'influe pas sur les résultats des épreuves. Des accès de réinoculation se produisent aussi bien après l'injection sous-cutanée de 1/10 de centimètre cube de sang virulent qu'après l'injection de 50 cent. cubes par la même voie.

5° FRÉQUENCE DES ACCÈS DE RÉINOCULATION SUIVANT LES SOUCHES DE VIRUS EMPLOYÉES POUR LES RÉINOCULATIONS D'ÉPREUVE. — a) I. 40 animaux ayant présenté un premier accès de theilériose après l'inoculation des souches *Jeannette*, *Babette* ou *Princeps* sont réinoculés, au bout d'un temps variable, avec les mêmes souches : pas de réaction.

II. 101 animaux ayant présenté un premier accès de theilériose après l'inoculation de la souche *Jacquot* sont réinoculés avec la même souche : 15 accès de réinoculation.

b) I. 120 animaux ayant présenté un premier accès de theilériose après l'inoculation des souches *Jeannette*, *Babette*,

Princeps ou de cinq autres souches diverses sont réinoculés avec la souche *Jacquot* : 44 accès de réinoculation.

II. 23 animaux ayant présenté un premier accès de theilériose après l'inoculation de la souche *Jacquot* sont réinoculés avec l'une des souches *Jeannette*, *Babette*, *Princeps* : 1 accès de réinoculation.

III. 7 animaux ayant présenté un premier accès de theilériose après l'inoculation de la souche *Princeps* ou de la souche *Cruchette* sont réinoculés soit avec la souche *Jeannette*, soit avec la souche *Babette* : pas de réaction.

Ainsi tous les accès de réinoculation, à l'exception d'un seul, ont été consécutifs à des réinoculations effectuées avec le virus *Jacquot*. Le fait concorde avec ce que nous avons déjà dit de la très grande virulence de cette souche. On ne peut cependant pas la considérer comme spécifiquement différente des autres souches puisque 15 p. 100 des animaux primo-infectés avec ce virus *Jacquot* présentent un nouvel accès lorsqu'on le leur réinocule.

6° FRÉQUENCE DES ACCÈS DE RÉINOCULATION SUIVANT L'INTENSITÉ DE L'ACCÈS DE PREMIÈRE INVASION. — Il n'y a aucun rapport entre l'intensité de l'accès de première invasion et la fréquence des accès de réinoculation récidives. Les accès graves de primo-inoculation protègent les animaux contre les accès de réinoculation ni plus, ni moins que les accès légers

7° EFFET DE PLUSIEURS RÉINOCULATIONS SUCCESSIVES CHEZ LE MÊME ANIMAL. — Lorsqu'on soumet un même animal à deux ou plusieurs réinoculations successives de theilériose, on obtient différents résultats.

a) Si l'inoculation primaire n'a pas produit de réaction appréciable, les animaux se comportent comme des animaux neufs et contractent la theilériose dès la première réinoculation (1), qu'ils aient ou non reçu antérieurement du virus latent. Un bovin en état « d'incubation longue » de theilériose est réceptif à l'égard du virus fixe au même degré que les témoins indemnes.

(1) Sauf le cas exceptionnel d'« immunité naturelle ».

b) Chez certains animaux ayant eu un accès de theilériose, on n'observe jamais de nouvel accès, quel que soit le nombre des réinoculations.

c) Chez d'autres animaux, la première réinoculation provoque un accès; les réinoculations ultérieures restent sans effet apparent.

d) Certains, réinoculés à deux reprises, présentent un accès après la seconde comme après la première réinoculation.

e) Enfin, quelques-uns ne réagissent pas à la première réinoculation et réagissent à la seconde.

8° FRÉQUENCE DES ACCÈS DE RÉINOCULATION SUIVANT LA SAISON.

— La saison n'influe pas d'une façon évidente sur les résultats des réinoculations. La proportion des accès de réinoculation a été de 18 % au printemps, de 30 % en été, de 26 % en automne, de 30 % en hiver.

9° INFLUENCE D'UN ACCÈS D'ANAPLASMOSE INTERCURRENT. — Un accès d'anaplasmose survenant entre la primo-inoculation et l'épreuve de réinoculation augmente notablement la fréquence des accès nouveaux. C'est là, vraisemblablement, un effet de l'action anémiant et débilitante, si marquée, de l'anaplasmose.

En résumé, la réinoculation expérimentale d'un virus fixe très virulent à des animaux guéris d'un accès aigu de theilériose est suivie d'un nouvel accès dans 22 p. 100 de cas. L'accès de réinoculation est d'autant plus fréquent que la réinoculation est pratiquée à une date plus éloignée de celle de la primo-infection. On peut le produire avec toutes les matières virulentes, le sang en particulier, et en utilisant toutes les voies d'introduction, la voie péritonéale exceptée, par laquelle on l'obtient rarement. Les accès de réinoculation sont, en général, beaucoup moins graves que les accès de première invasion. Etant donné l'existence d'un stade latent, postfébrile, de *Theileria dispar*, la résistance manifestée par les animaux guéris à l'égard des réinoculations ne correspond pas à un état d'immunité vraie, mais doit être considérée comme une prémunition. Cette prémunition, un peu différente de celle que l'on observe dans les infections à *P. bigeminum*, à *B. berbera* et *A. marginale*, n'est

procurée que par l'accès aigu de theilériose, comme si la pullulation plus ou moins massive des corps en grenade en était la condition nécessaire et suffisante. Le virus latent ne la confère pas pendant le stade préfébrile, c'est-à-dire aussi longtemps qu'il n'a pas provoqué l'accès aigu.

H. — *Essais de vaccination.*

Nous avons cherché à voir s'il était possible d'obtenir à coup sûr des réactions de primo-inoculation bénignes, soit en modifiant le virus, soit en variant le mode d'inoculation.

1° VACCINATION AU MOYEN DE VIRUS FORMOLÉ. — Du sang d'accès aigu a été mis en contact pendant quatre jours, à la température de 25°, avec une solution de formol du commerce (5 cent. cubes de solution pour 1 litre de sang), puis inoculé sous la peau de 3 veaux neufs, à des doses variant de 50 à 200 cent. cubes. Un mois plus tard, ces 3 veaux ont reçu les mêmes quantités du même sang formolé, conservé à la glacière. Ces deux inoculations vaccinales n'ont déterminé aucune réaction. Deux mois après la dernière, les 3 veaux sont éprouvés par l'inoculation sous-cutanée de 50 cent. cubes de sang et de 0 c.c. 5 de suc ganglionnaire provenant d'un animal en accès aigu de theilériose. Tous les trois contractent la theilériose, comme 2 veaux neufs témoins.

2° VACCINATION AU MOYEN DE FILTRAT DE SANG INFECTÉ. — Deux veaux sont inoculés avec le filtrat de 1.200 cent. cubes de sang virulent. Pas de réaction. Eprouvés trois semaines plus tard, ils contractent normalement la theilériose. Le filtrat ne les avait donc pas vaccinés.

Les résultats négatifs de ces deux essais de vaccination par le virus formolé et par filtrat de sang virulent confirment les conclusions du précédent paragraphe, à savoir qu'il ne peut y avoir prémunition sans infection et sans réaction manifeste de l'organisme.

3° VACCINATION AU MOYEN DE VIRUS ADDITIONNÉ DE SÉRUM D'ANIMAL GUÉRI. — Dans deux séries d'expériences, nous avons inoculé du

virus (sang) dilué au 1/10 dans du sérum d'animal guéri, après trois jours de contact à 10°-17°. Les animaux qui reçurent ce mélange sous la peau présentèrent un accès aigu de theilériose de même gravité que les accès de deux témoins inoculés avec le virus pur.

4° VACCINATION AU MOYEN DE VIRUS DILUÉ INOCULÉ A DOSES CROISSANTES. — Dans cinq séries d'expériences portant sur 16 ani-

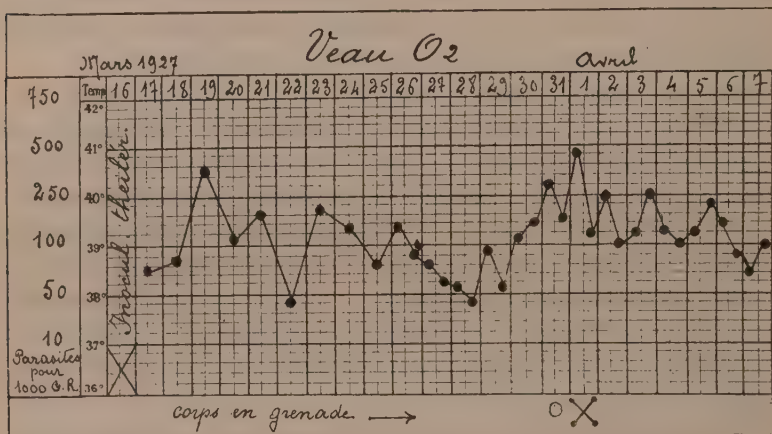


FIG. 23. — Vaccination préventive contre la theilériose.
Type de réaction vaccinale.

maux, du virus (sang), conservé à 18°-20° et dilué dans l'eau physiologique au moment de l'emploi, a été inoculé chaque jour, à doses croissantes, en partant de 1/1.000 ou de 1/100 de centimètre cube pour arriver à la dose de 1 ou 10 cent. cubes le septième ou le huitième jour. 10 animaux ont contracté la theilériose, 8 ont eu un accès faible, 2 un accès assez fort. Parmi les 6 bovins qui n'avaient pas réagi à la vaccination, 4 se montrent plus tard sensibles à une réinoculation d'épreuve.

Ce procédé de vaccination, dont les résultats apparaissent d'ailleurs comme inconstants, offre évidemment un intérêt plus théorique que pratique, car il serait d'une application difficile.

5° VACCINATION PAR DIVERSES VOIES. — Les inoculations sous-cutanées, intradermiques et intraveineuses donnent des accès

généralement plus graves que les inoculations intrapéritonéales. Mais, dans la pratique journalière, la voie péritonéale ne peut guère être adoptée en raison des complications septiques auxquelles elle expose.

6° VIRUS-VACCIN CONSTITUÉ PAR UNE SOUCHE NATURELLEMENT PEU VIRULENTE. — Il ne nous semble donc pas possible, actuellement du moins, d'atténuer artificiellement le virus de la theilériose, de façon à provoquer, dans tous les cas, une réaction vaccinale bénigne. Aussi avons-nous pensé à utiliser pour la vaccination prémunitive une souche de *Th. dispar* naturellement peu virulente. Comme nous l'avons déjà exposé, de telles souches existent, qui conservent leur caractère de bénignité au cours de nombreux passages en série.

On verra, dans la deuxième partie de ce mémoire, les résultats très favorables que la vaccination prémunitive contre la theilériose, ainsi comprise, nous a donnés au cours de quatre campagnes d'expérimentation.

Conclusions générales.

1° L'évolution de la theilériose à *Theileria dispar* comprend, comme celle des autres piroplasmoses nord-africaines, deux stades successifs : un accès aigu de première invasion et un stade d'infection chronique.

2° L'incubation de l'accès aigu expérimental est de durée extrêmement variable (de douze jours à treize mois au moins, d'après nos observations) et paraît dépendre de la quantité de virus inoculée.

3° Le virus prélevé au moment de l'accès aigu se comporte comme un *virus fixe*. Il provoque, chez les animaux inoculés, un accès aigu après une période d'incubation remarquablement régulière : seize à dix-sept jours en moyenne.

4° Le virus prélevé en dehors de l'accès aigu, c'est-à-dire soit pendant l'incubation, soit pendant le stade d'infection chronique, provoque un accès aigu tardif, survenant après une période d'incubation parfois très longue (jusqu'à treize mois). Ces *incubations longues* rappellent celles que l'on observe dans le paludisme et aussi dans la rage.

5° Exceptionnellement, le virus prélevé au moment de l'accès aigu peut donner un accès aigu après une longue incubation.

6° Quelle que soit la durée de la période d'incubation, l'accès aigu de theilériose présente toujours les mêmes caractères cliniques et parasitaires.

7° Chez les bovins guéris de l'accès aigu, l'infection chronique reste *latente*. La persistance du virus dans l'organisme n'est mise en évidence que par le résultat de l'inoculation de sang d'animal guéri à des animaux neufs. Le virus latent post-fébrile ne cause jamais d'accès de rechute.

8° Les animaux guéris d'un accès aigu de theilériose ont acquis une résistance particulière à la réinoculation de virus d'accès aigu (virus fixe); ils possèdent non pas l'immunité vraie, stérilisante, mais la prémunition.

9° La prémunition n'existe qu'à partir du moment où les animaux inoculés ont réagi à l'infection par un accès aigu franc. Durant toute la période des « incubations longues », au cours de laquelle le virus demeure latent dans l'organisme, la prémunition manque : pendant cette période, les bovins réinoculés avec du virus fixe sont surinfectés et présentent régulièrement un accès aigu de theilériose dans les mêmes délais que les témoins neufs.

10° De même que la prémunition contre la piroplasmose, la babésiellose et l'anaplasmose, la prémunition antitheilérique protège la plupart des animaux contre une contamination nouvelle. Lorsqu'un nouvel accès se produit malgré la prémunition, il est généralement moins grave qu'un accès de première invasion.

11° La vaccination prémunitive est donc applicable à la theilériose nord-africaine due à *Theileria dispar*.

La seconde partie de ce mémoire exposera nos essais de vaccination prémunitive contre les piroplasmoses bovines algériennes, effectués dans les conditions de la pratique, en pleine campagne.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

RECHERCHES ANATOMIQUES ET BACTÉRIOLOGIQUES SUR LE CANCER DES PLANTES

par J. MAGROU (1).

INTRODUCTION.

Les tumeurs des plantes ou « crown-galls » provoquées par le *Bacterium tumefaciens*, que nous avons étudiées dans de précédents Mémoires [2, 3], sont caractérisées par l'existence de structures rappelant l'anatomie de l'organe où elles ont pris naissance primitivement. C'est ainsi, par exemple, qu'une tumeur issue de la tige présentera la structure d'une tige, tandis que l'on retrouvera dans une tumeur originaire de la racine les dispositions anatomiques caractéristiques de cet organe. Ce caractère rapproche les galls dues au *Bacterium tumefaciens* des tumeurs proprement dites du règne animal, et les distingue des granulomes ou hyperplasies inflammatoires. Toutefois, dans le crown-gall comme dans les néoplasmes animaux, la structure des tissus de nouvelle formation peut se trouver plus ou moins déviée du type normal, et souvent même, la prolifération exubérante des cellules actives de la tumeur entraîne des dislocations des éléments anatomiques qui la rendent méconnaissable. Si bien que l'on peut appliquer au cancer des plantes la terminologie en usage chez les histopathologistes, en qualifiant d'atypiques les tumeurs à structure complètement désordonnée, et de typiques les tumeurs à ordonnance relativement régulière.

L'étude de ces dernières est particulièrement instructive pour qui cherche à comprendre l'histogénèse des cancers végétaux et à la comparer à celle des cancers animaux. Erwin F.

(1) Travail fait au laboratoire de Biologie expérimentale de M. le Professeur Gosset (Clinique chirurgicale de la Salpêtrière).

Smith en a signalé, à diverses reprises, des exemples, dont les plus remarquables consistent en l'existence de tiges surnuméraires parfaitement constituées, situées à l'intérieur de la tige primitive.

Dans une tige de Tabac inoculée avec le *Bact. tumefaciens*, Smith [10] a obtenu la formation d'un cylindre vésiculaire ou « stèle », englobé dans le parenchyme cortical près de la surface de la tige et donnant de place en place, sur cinq nœuds et entre-nœuds, une trentaine de petites tumeurs secondaires. Cette stèle intracorticale offrait de façon typique la structure d'un cylindre central de tige (1). Elle comprenait un bois central, découpé en faisceaux par des rayons médullaires, au delà duquel se trouvait une assise génératrice circulaire, entourée par un cylindre de liber contenant des tubes criblés bien développés.

Plus récemment, dans des tiges de Soleil (*Helianthus annuus*) inoculées avec le *Bact. tumefaciens*, Smith a observé, au centre de la moelle, une seconde tige pourvue d'un cylindre fibro-vasculaire composé de xylème, de cambium et de liber [12]. Il avait antérieurement obtenu le même phénomène chez des Ricins (*Ricinus communis*) inoculés non plus avec le *Bact. tumefaciens*, mais avec une substance chimique (solution à 5 p. 100 de phosphate monobasique d'ammonium) [41]. Mais, fait remarquable, dans ce cas, les tiges intra-médullaires avaient une polarité renversée; leurs faisceaux ligneux se trouvaient *en dehors* de l'assise génératrice, tandis que leur liber s'était développé *en dedans* de cette dernière. D'ailleurs, Smith avait déjà figuré antérieurement [9], chez des *Chrysanthemum frutescens* inoculés avec le *Bact. tumefaciens*, des stèles intra-médullaires à bois périphérique.

(1) Rappelons que la structure secondaire du cylindre central de la tige chez les Dicotylédones peut être schématisée comme il suit : la région centrale en est occupée par un parenchyme (moelle), plein ou creusé d'une lacune. La moelle est entourée par un manchon de bois ou xylème, formé de fibres et de vaisseaux à membranes lignifiées. Le xylème est entouré à son tour par un manchon de phloème ou liber, comprenant des fibres et des vaisseaux libériens (tubes criblés), à membranes cellulodiques. Entre le xylème et le phloème se trouve l'assise génératrice ou cambium, formé d'éléments dont l'active prolifération donne naissance à des files de cellules empilées dans le sens radial et qui se différencient, en dedans du cambium, en éléments ligneux, en dehors en éléments libériens.

L'anneau vasculaire libéro-ligneux peut être continu ou interrompu à intervalles réguliers par des « rayons médullaires » parenchymateux.

LES STÈLES SURNUMÉRAIRES DANS LE CANCER DES PLANTES.

J'ai constaté fréquemment la formation de stèles surnuméraires, intra-médullaires ou intra-corticales, dans des tumeurs de la tige obtenues par inoculation du *Bact. tumefaciens* chez diverses plantes : Soleil (*Helianthus annuus*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Ricin (*Ricinus communis*), *Pelargonium zonale*, etc. Dans tous les cas qu'il m'a été donné d'observer, les stèles surnuméraires développées dans l'écorce ont une polarité normale; elles comprennent, en effet, un liber périphérique et un bois central, séparés par une assise génératrice libéro-ligneuse. Au contraire, les stèles intra-médullaires offrent constamment le renversement de polarité que Smith avait décrit dans les tumeurs de Ricin d'origine chimique : les faisceaux libériens s'y développent en dedans, et les faisceaux ligneux en dehors de l'assise génératrice. Le parenchyme central de ces stèles interverties a les caractères d'une écorce; on y retrouve même, dans le cas de l'*Helianthus*, les canaux sécréteurs qui, dans la tige normale, sont situés dans le parenchyme cortical.

L'étude d'échantillons nombreux, débités en coupes, en série, fait comprendre la genèse de ces anomalies singulières [5]. La formation des galles sous l'influence du *Bact. tumefaciens* ou d'autres parasites résulte essentiellement de l'exagération de l'activité prolifératrice de l'assise génératrice libéro-ligneuse. M. Vuillemin, dès 1888 [13], mit clairement en évidence le rôle du cambium dans la genèse des tumeurs du Pin d'Alep, qui sont, comme le crown gall, des galles bactériennes. Il est à remarquer d'ailleurs que l'inoculation du *Bact. tumefaciens* reste sans effet chez les Monocotylédones qui sont, en règle générale, dépourvues d'assise génératrice libéro ligneuse (1).

Que va-t-il se produire lorsque, sous l'action stimulante des bactéries inoculées, le pouvoir de multiplication des cellules cambiales se trouvera accru? L'accélération des cloisonnements

(1) Smith [10] a obtenu, au moyen d'inoculations peu profondes, des tumeurs intra-corticales vascularisées sans connexion avec l'assise génératrice normale. Nous n'envisagerons dans cette étude que les tumeurs d'origine cambiale.

de l'assise génératrice dans le sens tangentiel aboutit à l'accroissement en épaisseur de la zone méristématique cambiale; par contre, les cloisonnements en surnombre dans le sens radial ont pour effet d'accroître la longueur de l'anneau de cambium qui, gêné dans son développement, ne peut rester circulaire, mais est contraint de prendre une forme sinueuse et de dessiner des évaginations qui font saillie dans l'écorce et des invaginations qui s'avancent dans la moelle (fig. 1 et 2). L'assise génératrice ainsi déformée continue à fonctionner comme à l'ordinaire, produisant du bois en dedans et du liber en dehors. Il en résulte



FIG. 1. — Coupe transversale d'une tumeur de la tige, provoquée chez le Soleil (*Helianthus annuus*) par l'inoculation du *Bact. tumefaciens* (figure schématique). Remarquer la forme sinueuse de l'assise génératrice ou cambium, représentée par un trait continu *c*, qui dessine des évaginations intra-corticales (*e*) et des invaginations intra-médullaires (*i*). Les faisceaux ligneux (*x*) sont représentés par des hachures, les faisceaux libériens (*ph*) par un pointillé. *sc*, stèles intra-corticales à polarité normale (bois interne *x* et liber interne *ph*), séparés par le cambium *c*; *sm*, stèle intra-médullaire à polarité renversée (bois externe et liber interne), encore rattachée à l'anneau fibro-vasculaire normal par un étroit pédicule (*p*). A la partie droite de la figure, région atypique de la tumeur, avec distorsion des vaisseaux; *cs*, canaux sécréteurs; *fp*, îlots de fibres péricycliques.

qu'au niveau d'une évagination de ce cambium sinueux les faisceaux libériens seront situés sur la convexité de la courbure, tandis que les faisceaux ligneux en occuperont la concavité (fig. 1, *e*); l'inverse se produira au niveau d'une invagi-

nation ou sinuosité à concavité externe: ici, les faisceaux libériens se logeront dans la concavité de la courbure, alors que le bois en occupera la convexité (fig. 1, *i*). Que les deux bords de la gouttière ainsi constituée viennent à se rapprocher, puis à se rejoindre, il en résultera l'isolement, au sein du parenchyme médullaire, d'une stèle à bois externe et à liber central (fig. 1, *sm*; fig. 3 et 4). S'il s'agit, au contraire, d'une gouttière à concavité interne, faisant saillie dans l'écorce, le rapprochement et la fusion de ses deux bords donnera naissance à une stèle intra-corticale à bois interne et à liber externe (fig. 1, *sc*).

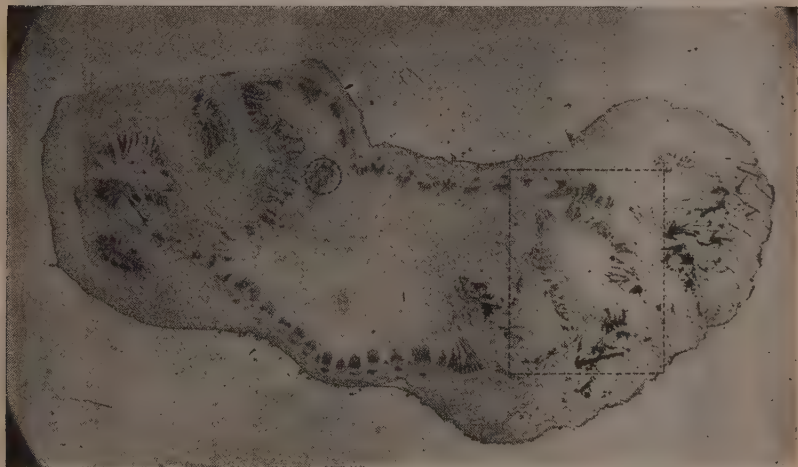


FIG. 2. — Photomicrographie de la coupe représentée schématiquement par la figure 1. Le rectangle et le cercle pointillés encadrent les régions représentées à de plus forts grossissements par les figures 3 et 4 (grossissement, 4,3 fois; cliché S. Tallard).

Il est facile de suivre le processus sur des coupes en série. Soit une coupe montrant une sinuosité de l'anneau vasculaire à concavité externe et à convexité refoulant le parenchyme médullaire (fig. 5, A). La gouttière ainsi formée est rattachée à l'anneau vasculaire normal par un isthme dont l'axe, formé de parenchyme médullaire est doublé, de dedans en dehors, par du liber, du cambium et du bois (fig. 5 et 6, A). Dans la série des coupes voisines, on verra cet isthme se rétrécir progressivement, puis s'étrangler, par jonction des deux bords de la gouttière.

Dès lors, il n'y aura plus un seul anneau libéro-ligneux sinueux et continu, mais deux anneaux concentriques et indépendants, dont l'un sera en quelque sorte l'image intervertie de l'autre (fig. 5 et 6, B). Par là s'explique le renversement de polarité qui



FIG. 3. — Détail plus grossi de la figure précédente, montrant une stèle intra-médullaire à bois périphérique et à liber interne : *fv*, anneau fibro-vasculaire normal de la tige ; *fm*, anneau fibro-vasculaire de la stèle intra-médullaire ; *x*, faisceaux ligneux ; *ph*, faisceaux libériens ; *c*, assise génératrice ; *e*, parenchyme central ayant la valeur d'une écorce, avec canaux sécréteurs ; *cs* ; *p*, isthme reliant à l'anneau fibro-vasculaire normal l'invagination qui a formé la stèle intra-médullaire (grossissement, 16 fois ; cliché Jeantet).

semble se produire dans les stèles intra-médullaires et qui n'est qu'une apparence trompeuse, résultant des plissements du cambium.

M. Vuillemin [14, 15], dans des broussins de la tige d'*Eucalyptus amygdalina* attribués à une Ustilaginée (*Ustilago vriesiana*), avait décrit des phénomènes d'invagination très comparables, sinon plus complexes, car ils portaient non seulement sur les éléments du cylindre fibro-vasculaire, mais sur des

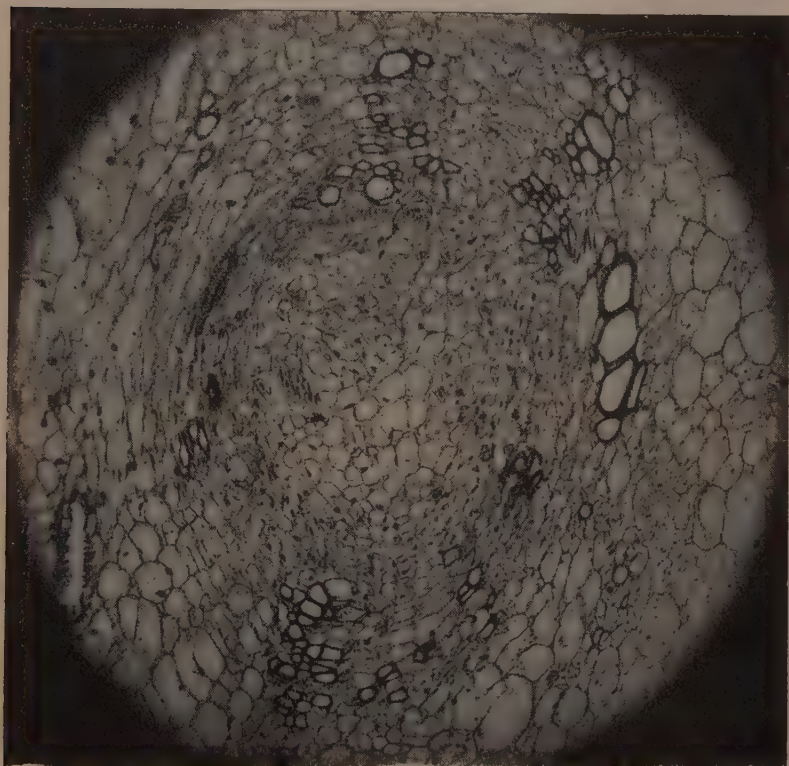


FIG. 4. — Stèle intra-médullaire à faisceaux ligneux périphériques et à liber central, dans une tige de Soleil inoculée avec le *Bacterium tumefaciens* (détail fortement grossi de la figure 2, cliché S. Tallard). Grossissement, 114 fois.

rameaux entiers. Dans ces cas, écrit M. Vuillemin, « l'exostose ligneuse du bois secondaire du tronc avait englobé les bourgeons adventifs nés sous la même influence irritante. Ceux-ci, au lieu de s'allonger librement au dehors, avaient été retournés pour ainsi dire par suite de leur condescence avec la néoplasie,

leur base étant progressivement entraînée vers la périphérie de la tumeur. On avait ainsi des rameaux invaginés, formant des canaux tortueux garnis de rudiments foliaires et autour desquels le bois de la tumeur se contournait en élégantes madrures ».

LES STÈLES SURNUMÉRAIRES EN ANATOMIE NORMALE.

Les anomalies de structure que nous venons d'étudier et qui, dans le cas du crown gall, sont d'origine parasitaire, ont leur équivalent dans l'anatomie normale de certaines plantes. Dans

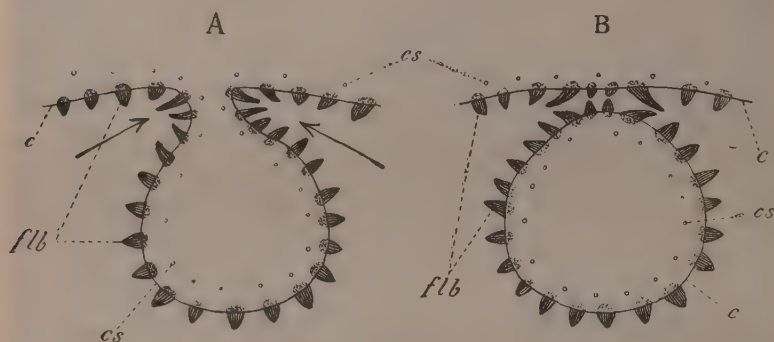
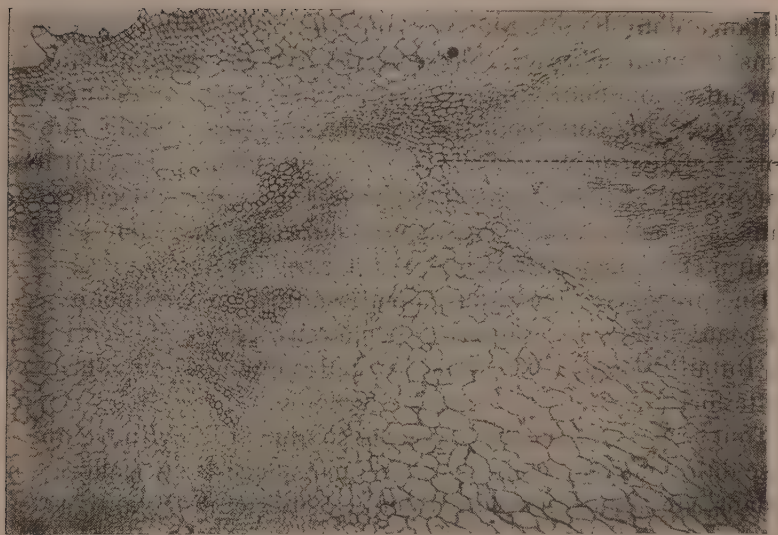


FIG. 5. — Schéma montrant la formation d'une stèle intra-médullaire. En A, invagination intra-médullaire de l'anneau fibro-vasculaire de la tige. Les deux bords de l'isthme qui rattache l'invagination à l'anneau vasculaire normal se rapprochent dans le sens indiqué par les flèches et tendent à se joindre. En B, la jonction est accomplie; l'isthme est supprimé et l'invagination est transformée en un anneau fibro-vasculaire complet, isolé dans la moelle, et présentant un liber interne et un bois périphérique. *c*, assise génératrice; *flb*, faisceaux libéro-ligneux (le liber en pointillé, le bois en hachures); *cs*, canaux sécréteurs.

l'inflorescence du Ricin, il existe dans la moelle, par conséquent à l'intérieur du cylindre vasculaire, des faisceaux libres dont la structure insolite a été longtemps un objet d'étonnement pour les anatomistes. Ces faisceaux médullaires de l'inflorescence se composent, en effet, selon la description de Sachs, d'un mince faisceau axile de liber, entouré par un étui de bois dont les cellules sont disposées en séries rayonnantes. Ils ont donc une polarité renversée.

M. Dutailly [1] a réussi à expliquer le mode de formation de ces faisceaux intra-médullaires, homologues des faisceaux qui

A



B



FIG. 6. — Photomicrographies représentant le phénomène schématisé par la figure 5. En A, invagination de l'anneau fibro-vasculaire, dont on voit l'isthme en *i*. En B, l'étranglement de l'isthme est accompli, par jonction de ses deux bords; il en résulte la formation de deux anneaux fibro-vasculaires distincts *a* et *a'*, dont les éléments ligneux se font face en *i* (grossissement, 32 fois; cliché Jeantet).

forment les diaphragmes situés aux nœuds de la portion végétative de la tige du Ricin. Dans une coupe pratiquée à peu de distance d'un diaphragme, on voit une sorte de pli se former dans l'anneau fibro-vasculaire libéro-ligneux, qui se déprime suivant sa longueur, pour constituer une gouttière à concavité externe. Dans cette concavité se place le liber, tandis que le bois s'étale sur la convexité. On voit bientôt la gouttière s'accroître et une partie du petit faisceau passer décidément dans la moelle, où il s'isole pour constituer une stèle à liber central et à bois périphérique.

Un processus analogue, aboutissant à la production de faisceaux intra-médullaires à polarité renversée, a été décrit par M. Dutailly chez d'autres plantes, telles que le Chou cabrus et le Raifort.

Tout se passe dans ces divers cas comme si le cylindre fibro-vasculaire normal était repoussé par places, de dehors en dedans, de manière à constituer à l'intérieur de la tige des sortes de doigts de gants. Le liber, qui était d'abord extérieur, devient interne, et le bois reste à la périphérie. C'est ce même processus qui donne lieu chez la Rhubarbe (*Rheum officinale*), à la production des faisceaux étoilés intra-médullaires à bois périphérique, dont la structure avait longtemps paru incompréhensible. Ces diverses formations sont homologues des faisceaux intra-médullaires du crown gall; leur histogénèse est exactement la même.

Ce qui se passe dans ces cas est tout à fait l'inverse de ce que l'on observe dans la tige de certaines lianes de la famille des Sapindacées. Chez ces dernières, un certain nombre de faisceaux libéro-ligneux, après avoir fait partie du cercle fibro-vasculaire normal, se dévient vers l'extérieur, puis replient leurs bords vers l'intérieur et figurent alors une sorte de gouttière dans la concavité de laquelle est le bois et dont les deux bords se rapprochent bientôt et se réunissent pour constituer finalement un faisceau cylindrique dont le bois est au centre et le liber à la périphérie. On retrouve là le même processus qui aboutit dans le crown gall à l'isolement de stèles intra-corticales à polarité normale, c'est-à-dire à liber périphérique et à bois central.

HISTOGÉNÈSE COMPARÉE DES TUMEURS VÉGÉTALES ET ANIMALES.

Le renversement apparent de polarité qui caractérise les stèles intra-médullaires du crown gall est à rapprocher, d'autre part, de certains processus communs dans les cancers du règne animal. Les globes cornés des cancers épidermiques ont, eux aussi, une polarité qui semble à première vue renversée; leur centre, occupé par des cellules kératinisées, est l'homologue de la surface épidermique normale, tandis qu'à leur périphérie se trouve l'assise germinative qui, normalement, est située à la base de l'épiderme. Cette structure paradoxale résulte de plissements de l'assise basale de l'épithélium, qui, gênée dans son développement par suite de sa prolifération excessive, s'est invaginée dans la profondeur du tissu conjonctif sous-jacent. Une telle convergence entre l'histogénèse du crown gall et celle des tumeurs malignes du règne animal fournit un nouvel argument en faveur de la nature cancéreuse des galls produites par le *Bacterium tumefaciens*.

LE BACT. TUMEFACIENS DANS LES TISSUS DU CANCER DES PLANTES.

Les descriptions qui précèdent montrent les profondes perturbations que le *Bact. tumefaciens* entraîne dans le fonctionnement de l'assise génératrice, perturbations qui résultent essentiellement de l'accélération des divisions cellulaires. Pourtant, s'il est vrai que l'inoculation porte les germes jusque dans le cambium et même au delà, l'examen microscopique le plus minutieux ne permet pas de les retrouver au cours de l'évolution des tumeurs, dans l'assise génératrice et dans les foyers hyperplasiques qui en dérivent. Par des méthodes d'imprégnation au chlorure d'or, Smith [9] avait mis jadis en évidence, au sein des tumeurs, des inclusions intracellulaires qu'il considérait comme des bactéries, mais il a renoncé ensuite à cette interprétation. « Dans le crown gall, écrivait-il dans une de ses récentes publications [12], les bactéries sont relativement rares. Il est possible de les isoler par les méthodes de la bactériologie. Mais on ne les trouve pas au microscope, sauf au voisinage de la piqûre, et je pense que la cause de cette maladie

resterait indéterminée si l'on s'était borné à faire des recherches avec le microscope. »

Toutefois, s'il est difficile, sinon impossible, de déceler les bactéries dans les cellules des foyers en voie de prolifération active, on peut, dans certains cas, les mettre en évidence à la périphérie de ces derniers. Chez le *Chrysanthemum frutescens* inoculé avec le *Bact. tumefaciens*, ce microorganisme se développe abondamment, comme l'ont montré MM. Robinson et Walkden [8], à la surface des tumeurs. Dans les tumeurs de *Pelargonium*, M. Pinoy [6] a mis en évidence le *Bact. tumefaciens* dans les grandes cellules chargées de tannin qui entourent les nodules néoplasiques (1).

Dans des coupes de volumineuses tumeurs caulinaires de Tomates, prélevées et fixées deux à cinq mois après l'inoculation du *Bact. tumefaciens*, j'ai observé, après coloration par la pyronine (2), de très nombreuses bactéries situées à la surface de la galle ou n'envahissant que ses assises cellulaires les plus superficielles [4]. Les bactéries font défaut partout où l'épiderme a conservé son intégrité, et n'existent que là où il a été déchiré et détruit par la poussée du néoplasme sous-jacent. Les tissus envahis sont toujours formés de grandes cellules sans noyau, à parois souvent épaissies, paraissant mortes. Les nodules néoplasiques, formés de petites cellules en voie de prolifération, sont toujours indemnes d'infection, ou, s'il arrive qu'un îlot tumoral superficiel soit envahi, les éléments parenchymateux en sont complètement détruits, et il n'en

(1) Rappelons que, chez de très jeunes tumeurs de Tomates, M. Riker [7], grâce à une méthode de coloration particulière, a réussi à teindre les bactéries, groupées en amas dans les espaces intercellulaires autour desquels s'amorce la prolifération cellulaire. J'ai pu faire la même observation, en usant de la technique de M. Riker. Les bactéries ainsi observées sont de très petite taille et paraissent dégénérer rapidement, les amas qu'elles constituent se transformant en masses amorphes, surcolorables.

(2) Pyronine, en grammes	0,5
Vert de méthyle, en grammes	0,15
Alcool à 96°, en cent. cubes	3
Glycérine, en cent. cubes	20
Eau distillée phéniquée à 2 p. 100, en cent. cubes . . .	100

Les coupes, fixées au réactif de Brazil-Masson, sont colorées vingt-quatre heures à froid dans ce mélange. Je dois cette formule, excellente pour la coloration des bactéries Gram-négatives dans les coupes, à l'obligeance de M. le Professeur Cantacuzène. On peut aussi colorer les bactéries par l'hématoxyline/ferrique.

subsiste que les vaisseaux, parfois remplis de bactéries.

Ces bactéries se présentent sous forme de courts bâtonnets réunis en amas homogènes et très denses (fig. 7), qui remplissent parfois la cavité des cellules, mais se localisent plus volontiers dans les espaces intercellulaires, qu'elles distendent fortement. Ce n'est qu'au bord des plages envahies qu'elles apparaissent isolées les unes des autres. Au sein des amas homogènes, on voit souvent les bactéries se condenser en sphérules

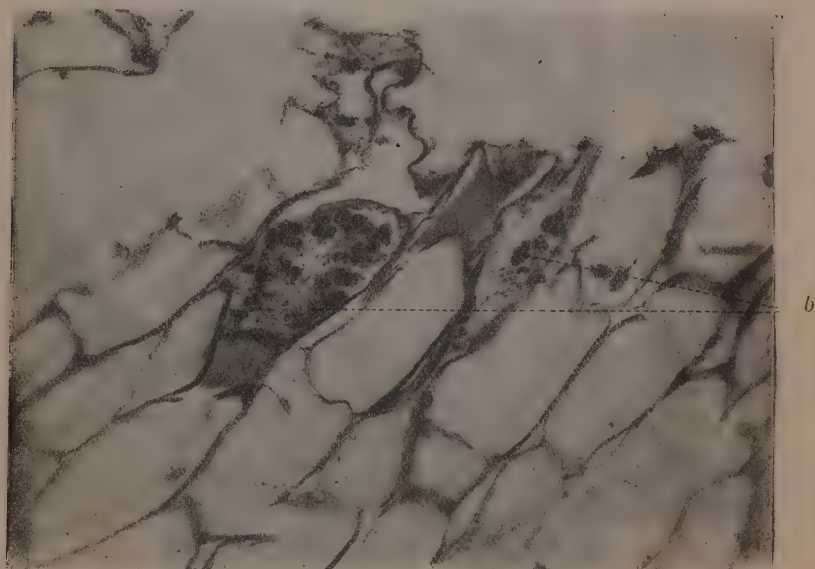


FIG. 7. — Coupe dans la région superficielle d'une tumeur de Tomate, deux mois après l'inoculation du *Bact. tumefaciens*. On voit les bactéries, groupées en amas compacts (b), qui envahissent un parenchyme formé de grandes cellules à parois épaissies (grossissement, 297 fois ; cliché Jeantet).

ou cordons, sortes de zooglées formées de bâtonnets (fig. 8) régulièrement alignés et enrobés dans une gangue.

En raison de la situation très superficielle de ces micro-organismes, il convenait de vérifier s'il s'agissait bien du *Bact. tumefaciens*, et non d'une infection banale surajoutée. A cet effet, une tumeur de Tomate, prélevée deux mois après l'inoculation, fut lavée dix minutes, sans désinfection préalable, dans de l'eau stérilisée. Une goutte de l'eau de

lavage fut mise en suspension dans un tube contenant de la gélose nutritive fondue, qui fut coulée en boîte de Petri. Dans la boîte ainsiensemencée se développèrent environ 800 colonies bactériennes blanches, toutes semblables, ayant les caractères des colonies de *Bact. tumefaciens* (fig. 9, en haut). La même expérience, répétée à partir d'une autre tumeur de Tomate de même âge, donna un résultat semblable,



FIG. 8. — Détail très fortement grossi de la figure précédente, *p*, parois cellulaires épaissies; *z*, zooglées formées par des bactéries groupées en sphérules et enrobées dans une gangue; *b*, bactéries isolées (grossissement, 1.111 fois; cliché Jeantet).

à cela près qu'il se développa, en outre de plusieurs centaines de colonies blanches de type *tumefaciens*, un petit nombre de colonies jaunes d'un germe surajouté. Dix-neuf des colonies blanches de l'une et l'autre boîte furent repiquées et inoculées à autant de *Pelargonium*, chez lesquels elles provoquèrent la formation de tumeurs caractéristiques. La preuve était ainsi faite qu'il s'agissait bien du *Bact. tumefaciens*. Par contre, un ensemencement pratiqué de la même manière à partir d'un fragment prélevé, après désinfection superficielle,

dans la profondeur d'une tumeur, ne donna lieu à aucun développement microbien (fig. 9, en bas), ce qui montre que



FIG. 9. — Résultats des ensemencements en boîte de Petri pratiqués à partir de tumeurs de Tomates.

En haut, ensemencement d'une goutte d'eau de lavage de la surface de la tumeur. Nombreuses colonies de *Bacterium tumefaciens*, superficielles (grandes colonies rondes), ou développées dans la profondeur de la couche de gélose (petites colonies lenticulaires).

En bas, ensemencement à partir d'un fragment prélevé dans la profondeur de la tumeur; absence de développement microbien (Cliché S. Tallard).

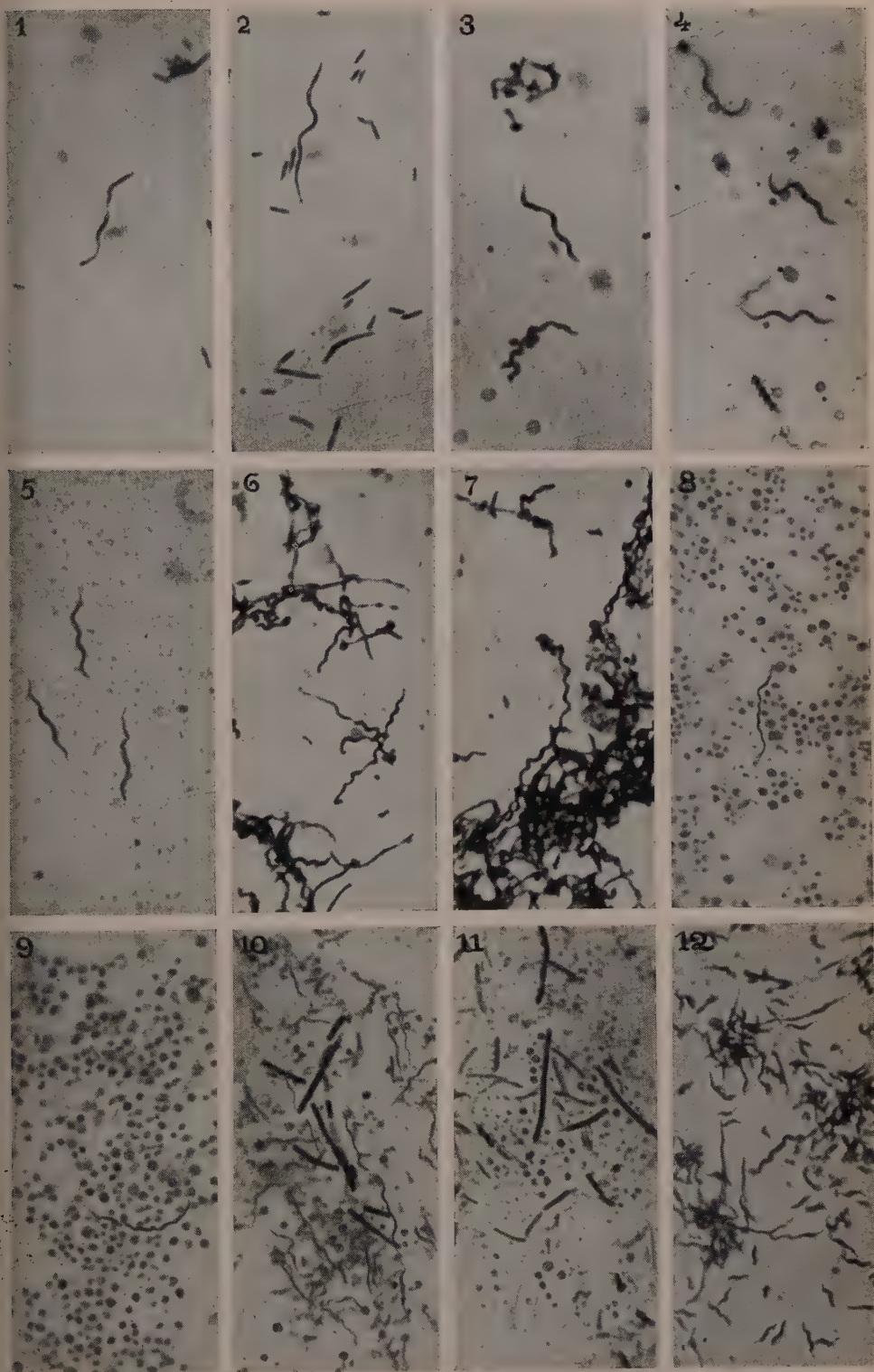
les bactéries, très abondantes à la surface des galls, font défaut dans l'intimité de leurs tissus.

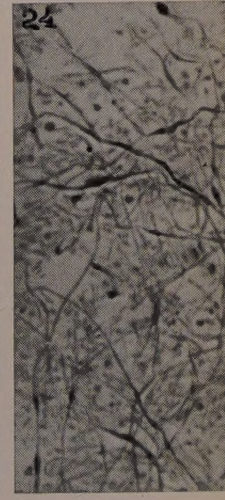
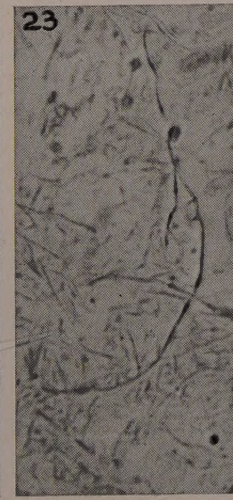
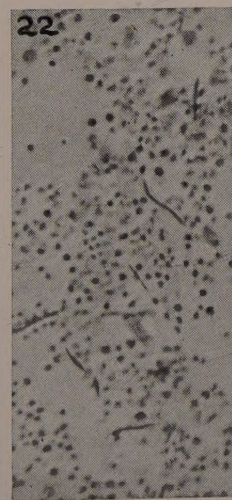
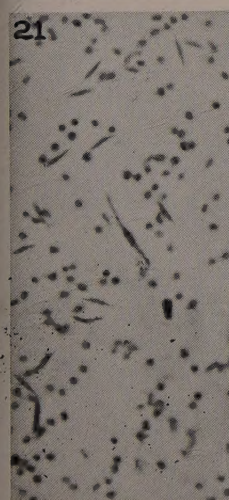
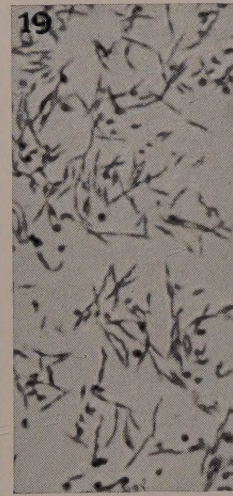
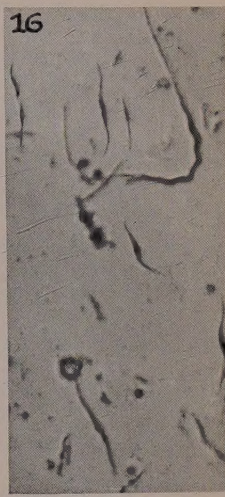
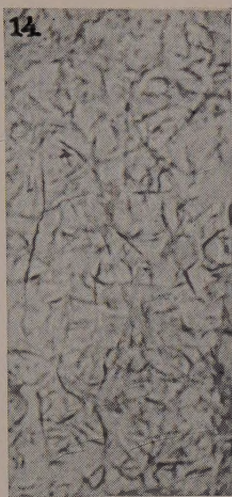
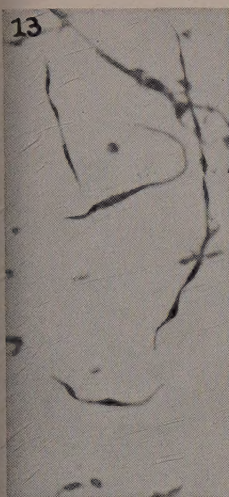
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

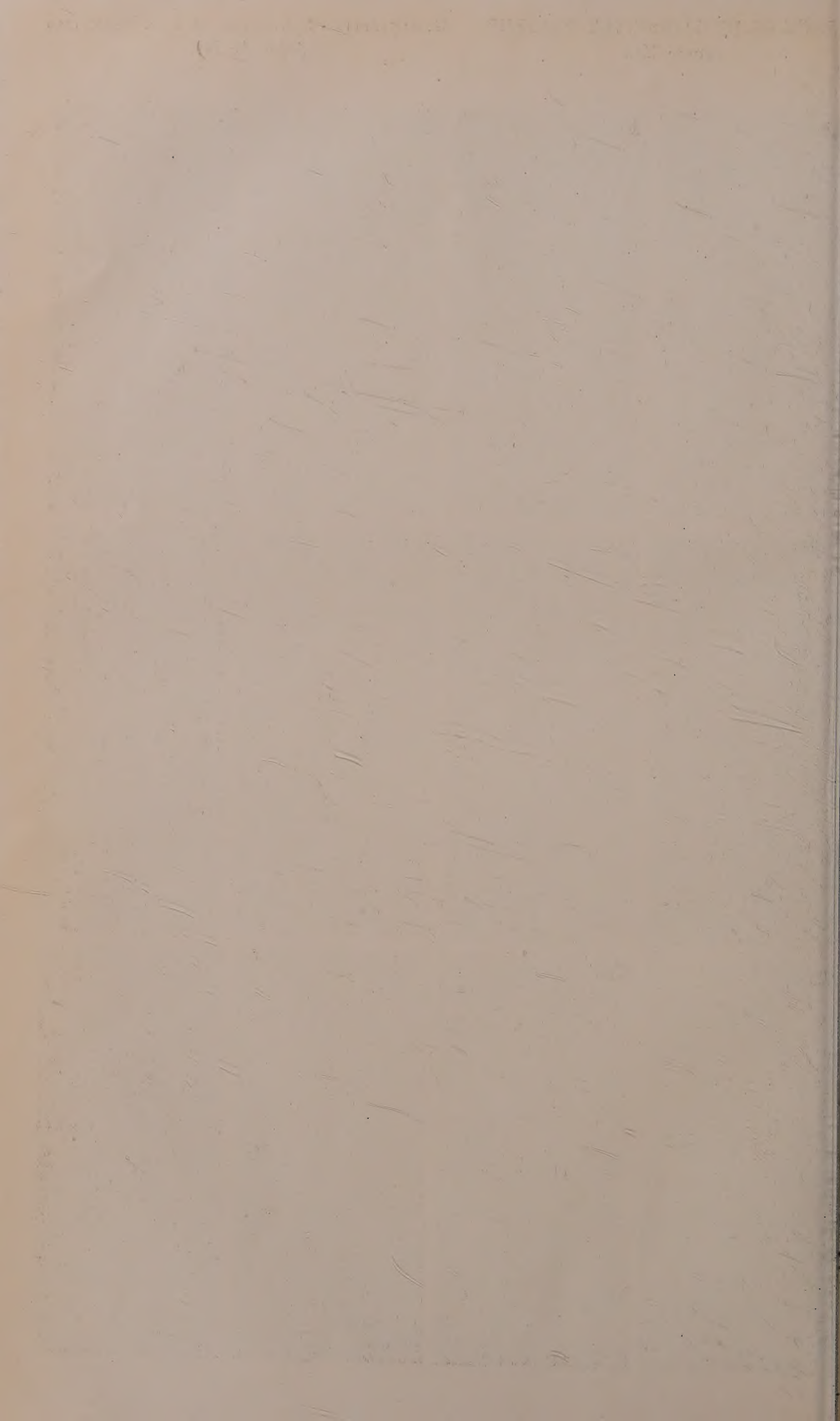
1° Dans les tumeurs végétales dues au *Bact. tumefaciens*, l'assise génératrice libéro-ligneuse, dont l'activité est exaltée sous l'influence du parasite, prend une forme sinueuse, dessinant des gouttières à convexité dirigée soit vers la moelle, soit vers l'écorce. Ces gouttières combiales, avec les faisceaux libéro-ligneux qui en dérivent, peuvent s'isoler de l'anneau fibro-vasculaire normal, pour former des stèles intra-médullaires à liber central et à bois périphérique, et des stèles intra-corticales à liber périphérique et à bois central. Le renversement apparent de polarité qui caractérise les stèles intra-médullaires s'explique par l'origine de ces formations.

2° Un processus identique se retrouve à l'état normal chez certaines plantes; il aboutit chez le Ricin, le Raifort, le Chou cabrus, la Rhubarbe, à l'isolement de stèles intra-médullaires à liber central et à bois périphérique; chez certaines lianes (Sapindacées), à l'isolement de stèles intra-corticales à liber périphérique et à bois central. Ce sont de même des plissements et des invaginations d'assises génératrices qui expliquent, dans les tumeurs animales, le renversement apparent de la polarité normale qui caractérise certaines structures (globes cornés des cancers épidermiques). Il y a donc convergence entre l'histogénèse de ces tumeurs et celle du cancer des plantes.

3° Chez les tumeurs de Tomate produites par le *Bact. tumefaciens*, l'examen microscopique et la culture montrent que ce microorganisme se développe abondamment dans les tissus superficiels de la galle, formés de cellules adultes ou mortes, alors qu'il fait défaut, tout au moins sous sa forme visible et cultivable, dans les îlots néoplasiques en voie d'accroissement. Ces observations, qui concordent avec celles de MM. Robinson et Walkden et celles de M. Pinoy, relatives au Chrysanthème et au *Pelargonium*, suggèrent que l'agent du cancer des plantes agit à distance, par un mécanisme qu'il reste à élucider, sur les cellules cambiales dont il provoque la prolifération.







BIBLIOGRAPHIE

- [1] DUTAILLY (G.), Sur quelques phénomènes déterminés par l'apparition tardive d'éléments nouveaux dans les tiges et les racines de Dicotylédones. *Thèse Fac. des Sc. de Bordeaux*, 1879.
- [2] MAGROU (J.), Recherches expérimentales sur le cancer des plantes. *Ces Annales*, **38**, octobre 1924, p. 851.
- [3] MAGROU (J.), Les tumeurs des plantes. *Travaux de la Clinique chirurgicale de la Salpêtrière*, publiés par A. Gosset, 1^{re} série, 1926, p. 141-162.
- [4] MAGROU (J.), Le *Bacterium tumefaciens* dans les tissus du cancer des plantes. *C. R. Acad. des Sc.*, **183**, novembre 1926, p. 804.
- [5] MAGROU (J.), Sur l'anatomie du cancer des plantes ou crown gall. *Ibid.*, 22 novembre 1926, p. 986.
- [6] PINOY (E.), A propos du cancer des plantes ou crown gall. *C. R. Acad. des Sc.*, **180**, janvier 1925, p. 311.
- [7] RIKER (A. J.), Some relations of the crown gall organism to its host tissue. *Journ. Agric. Research*, **25**, juillet 1923, p. 419-432.
- [8] ROBINSON (W.) et WALKDEN (H.), A critical study of crown gall. *Ann. of Bot.*, **37**, n° 146, avril 1923, p. 299-324.
- [9] SMITH (E. F.), BROWN (N. A.) et MC CULLOCH (L.), The structure and development of crown gall : a plant cancer. *U. S. Dept. Agr., Bureau Plant Industry, Bull.* 255, 1912.]
- [10] SMITH (E. F.), BROWN (N. A.) et MC CULLOCH (L.), Crown gall studies showing changes in plant structures due to a changed stimulus. *Journ. Agric. Research*, **6**, n° 4, avril 1916, p. 179-182.
- [11] SMITH (E. F.), BROWN (N. A.) et MC CULLOCH (L.), Mechanism of tumor growth in crown gall. *Journ. Agric. Research*, **8**, n° 5, janvier 1917, 165-186.
- [12] SMITH (E. F.), Le crown gall. *Rev. Pathol. végét. et Entomol. agric.*, **11**, fasc. 4, 1924, p. 219.
- [13] VUILLEMIN (P.), *C. R. Acad. des Sc.*, **107**, 188, p. 874 et 1184.
- [14] VUILLEMIN (P.), Les broussins des Myrtacées. *Ann. Sc. agron. française et étrangère*, **2**, 1893.
- [15] VUILLEMIN (P.), Les tumeurs des plantes comparées aux tumeurs animales. *Biologica*, 3^e année, n° 28, avril 1913, p. 104-109.

Le Gérant : G. MASSON.

